(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[6]
A61K 9/127

(45) 공고일자 2002년07월03일
(11) 등록번호 10-0315213
(24) 등록일자 2001년11월08일

(21) 출원번호 10-1995-0704156
(22) 출원일자 1995년09월27일
번역문제출일자 1995년09월27일
(86) 국제출원번호 PCT/US1994/03674
(86) 국제출원일자 1994년04월04일
(81) 지정국 국내특허 : 오스트레일리아 일본 대한민국 EP 유럽특허 : 덴마크 모나코

(65) 공개번호 특1996-0700691
(43) 공개일자 1996년02월24일
(87) 국제공개번호 WO 1994/22430
(87) 국제공개일자 1994년10월13일

(30) 우선권주장 08/041780 1993년04월02일 미국(US)

(73) 특허권자 더 리포좀 컴퍼니, 인코퍼레이티드 질레스피 카롤
미국, 뉴저지 08540, 프린세톤, 프린세톤 포레스탈 센터, 원 리서치웨이

(72) 발명자 코로이든
미합중국,뉴저지08505,보든타운,하노버코트17
에드제리-페루그로우라
미합중국,뉴저지08884,스포츠우드,와이밍에브뉴266
보니로렌
미합중국,뉴저지08852,몬마우스정션,헴로크코트1010

(74) 대리인 강명구

심사관 : 윤경애

(54) 리포좀생산방법

명세서

도면의 간단한 설명

<1> 제 1 도는 리포좀을 만들기 위한 반응기의 사시도이다.

<2> 제 2 도는 제1도의 반응기에 사용된 임펠러의 평면도이다.

<3> 제 3 도는 점성겔 중간생성물의 전자현미경도이다.

<4> 제 4 도는 리포좀 집단의 단일-모델 크기 분포도이다.

<5> 제 5 도는 리포좀 집단의 단일-모델 크기 분포도이다.

<6> 제 6 도는 리포좀 집단의 단일-모델 크기 분포도이다.

<7> 제 7 도는 총 젠타마이신 혈장농도이다.

<8> □는 조정 pH(약 6.5); ■: 투여된 낮은 pH제형.

<9> 제 8 도는 자유 젠타마이신 혈장농도이다.

<10> 제 9 도는 총괄적 그리고 자유 젠타마이신 혈장농도이다.

<11> 제 10 도는 pH 조정된 것과 더낮은 pH제형의 AUC 비(자유/총).

<12> 제 11 도는 젠타마이신의 누적된 뇨방출.

<13> 제 12 도는 중간지점에서 젠타마이신 뇨방출속도 대 시간.

<14> 제 13 도는 시험관에서 젠타마이신 누출검사.

발명의 상세한 설명

<15> 본 출원의 여기에 참고문헌으로 기록된 미국출원 08/041,870의 연속출원이다.

<16> 본 발명은 기존공정 보다 용매가 덜 요구되는 리포좀을 준비하는 공정에 관계한다. 본 발명의 공정에 의해 만들어진 신규한 중간 생성물 또한 상술한다. 본 발명은 두가지-상시스템에서 리포좀을 생상하는 방법에 관계하고, 리포좀의 소요평균 입라 크기는 미리 선택되고 소요의 평균입자 크기의 우수한 분포는 적절한 혼합속도, 비활성기체 유동속도와 반응온도의 선택에 의해 이루어진다.

<17> 리포좀은 물과 혼합될 수 없는 상과 수용성 상을 이용하여 두개상 혼합과정에 의해 준비된다. 이 공정에서 양쪽성 지질 또는 지질혼합물은 디에틸 에테르, 메틸렌 클로라이드, 폴로오린화된 탄화수소, 이

의 혼합물과 같은 물과 섞일 수 없는 유기용매에 용해된다. 이 용액에 물 또는 용해된 염 또는 완충액 그리고 리포좀의 내수용성 공간과 관계된 친수성 약물(가령, 젠타마이신)과 같은 선택적 생활성제를 첨가한다. 리포좀 제조동안에 형성되는 인지질 이중층은 수용성 내공간과 다른 수용성 환경 사이의 장벽으로 작용하기 때문에 다양한 수용성 생활성제가 내수용성 공간에서 격리된다. 친지성 약물(가령 프로스타글란딘)은 리포좀의 수소성 부분과 연계하여 또한 분리되고 이경우 친지성 약물은 유기상에 포함될 수 있다.

<18> 이중상 혼합물은 유기용매가 기화하는 동안에 유기상내에 수용성상의 분산에 의해 리포좀으로 전환된다. 용매를 제거하기 위한 적절한 기화기술에는 혼합물 위로 비활성 기체 기류를 통과시키거나, 혼합물을 가열하거나 또는 진공에 의해 혼합물 위로 압력을 감소시키는 것을 포함한다.

<19> 일부 기존기술에서 지질을 용해시키는데 사용되는 용매용적은 수용성 물질을 완전하게 유화시키기에 충분하 양으로 수용성 용적을 초과할 수도 있다. 가령, 미국특허 4,522,803 에서 제시된 일부예에서 수용성 상 1 용적에 유기상 3 용적이 최소한 사용되었다. 형성공정에서 용매의 상대적으로 많은 양의 사용은 리포좀 생성비용이 상당히 증가하게 한다. 이는 용매비용 뿐만아니라 공정동안에 용매를 제거하는데 소요되는 시가이 추가되기 때문이다. 따라서 훨씬 낮은 농도의 용매를 이용하는 리포좀의 생산공정을 제안하는데 유용하다.

<20> 리포좀 제작의 한 방법에서 유기와 무기상은 일반적으로 혼합 어셈블리가 갖추어진 반응기내에 복합된다. 복합된 상은 유기용매가 제거되는 동안에 가열하게 함께 혼합된다. 이는 일반적으로 혼합물을 통하여 비활성 기체(가령 질소기체)의 흐름에 의해 이루어지고 이와 같은 공정은 스파르징이라 한다.

<21> 생성 리포좀은 일반적으로 상대적으로 작은 리포좀(100-200nm)내지 매우 큰 리포좀(500nm 이상)의 매우 다양한 크기를 가진다. 따라서 생성 리포좀 집단의 평균입자 크기는 배치(batch)마다 매우 다양하다. 따라서, 물과 섞일 수 없는 유기용매를 이용하여 만들어진 리포좀은 종종 다양한 범위의 입자크기 분포를 가지고 다양한 입자크기의 한 집단이상이 되는 다중모델이 될수 있다.

<22> 일부 이용에서는 다소 입자크기 분포가 적은 리포좀 집단이 바람직하다. 특히 리포좀의 상당비율이 작은 크기인 단일 모델 집단분포가 바람직하다.

<23> 통상적으로, 다양한 리포좀 집단은 일정크기의 필터를 통하여 수차례 리포좀을 통과시킴으로써 단일-모델 집단분포로 전이될 수 있다. 필터의 구멍크기는 소요의 평균입자크기와 거의 동일하다. 필터과정 동안에 일부 큰 리포좀은 필터를 통과하는 동안에 크기가 감소되고 따라서 소요의 평균입자 크기를 가지는 집단이 증가하게된다.

<24> 그러나, 소요의 좁은 입자크기 분포를 가지는 리포좀 집단을 수득하기 위해 필터를 통하여 수회 통과하게 된다. 따라서 필터과정은 상당한 시간이 소요도고 따라서 리포좀 생성비용이 상당히 추가된다.

<25> 따라서, 상단한 생산후 공정인 필터공정없이 리포좀 집단을 얻는 공정을 제공하기 위한 상당한 진전이 있고 특히, 단일 모델 집단분포를 가지는 리포좀 집단을 얻을 수 있다.

<26> 또한 평균 입자크기는 미리 선택하고 미리 선택된 평균입자 크기를 포함하는 단일 모델 집단분포를 생산하는 방식으로 공정이 실행되는 리포좀 생성공정을 제공하는 본 기술분야에 더 나은 진보를 제공하는 것이다.

<27> 리포좀은 6개월이상 칼슘이온과 같은 작은 분자로부터 포획된 물질을 분리시킬 수 있다. 리포좀에 의해 포획된 생활성제의 안정성은 얼마나 많은 생활성제가 특정시간동안 누출되는가를 측정하는 것으로 된다. 가령, 중성 pH 에서 등장염을 포함하는 왕충액에 리포좀을 둘경우, 생황성제(가령, 친수성 또는 친지성 약물)을 포함하는 리폼좀은 저장에 상당한 안정성을 나타낸다.

<28> 상당시간동안 외부 환경으로부터 차단된 공간을 분리시키는 리포좀의 능력에 상당한 영향을 끼치는 인자가 적어도 2개있다. 한 인자는 지질은 남겨두고, 막에 구멍을 내는 이중층 구조를 파괴하는 외부환경에 있는 물질의 존재이다. 다른 인자는 지질의 자기-산화로써 지질의 탄화수소 사슬이 이중층을 불안정하게하는 과산화물을 형성한다. 산화속도와 이중층 불안정화는 리포좀 제조물에 부틸화된 하이드록시 툴루엔(BHT)와 같은 항산화제의 첨가에 의해 감소된다.

<29> 자기-산화속도는 리포좀 생산에 사용되는 배지의 pH 에 의해서도 영향을 받는다. 기존방법에서 진행매질의 pH 는 리포좀의 수용성부분에서 분리된 생활성제와 대부분이 필적하는 범위의 것이된다. 그러나, 일부 생활성제(가령, 젠타마이신)은 일반적으로 이중층을 불안정하게하는 지질물질에 역효과를 주는 pH범위(가령 4.4-4.6)에서 현탁액으로 존재한다.

<30> 따라서, 자기-산화속도를 낮춤으로써 리포좀의 안정성을 개선시키기 위해 지질 이중층과 좀더 적용할 수 있는 pH 에서 공정을 실행하는 것이 리포좀 제조에 상당한 진보가 있고 따라서 상당 시간동안 리포좀내에 높은 수준의 생활성제를 유지시켜준다.

<31> 발명의 요약

<32> 본 발명은 기존의 방법에 비해 더 적은 용매가 요구되는 리포좀 생산공정에 일반적으로 관계한다. 이 공정은 유기상내에 수용성상을 완전히 유화시킬 필요성이 없는 것에 기초한다. 복합상은 대신에 흐린 현탁액 형으로 존재하고 리포좀으로 진행된다. 본 발명에 따른 용매와 수용성 상의 용적비는 일반적으로 3:1 인데 적절하게는 0.2:1 내지 1.0:1 이다. 복합상은 지질물질과 가장 적응을 잘하는 범위내의 pH 에서 진행되는데 적절하게는 5.5 대 7.5 가장 적절한 것은 약 6.5 이다. 복합된 수용상과 유기상에 지질농도는 적어도 10mg/ml 이 된다.

<33> 생상된 리포좀은 수용성 부분내에 포획된 용질로 구성된 다층 리포좀인데 이때 각 수용성 부분에 있는 용질의 농도는 라멜라간 용질붙포와 실제 동일한 다층 라멜라 리포좀과 동일하다.

<34> 복합상의 고정동안에 점성겔의 형으로된 중간 생성물이 생산될 수도 있다. 겔은 지질 이중층 형성공정에 있는 지질물질로 구성된다. 이 중간생성물은 아미노글리코시드 항생제 또는 유사체 또는 유도체

와 같은 생활성제의 국소투여용 담체로 다양한 감염의 치료 및 예방에 사용될 수 있다.

<35> 발명의 또다른 편에서, 공정은 일반적으로 미리 선택된 평균입자크기를 포함한 단일-모델 집단분포를 가지는 리포좀 제조에 관한다. 여기에서 사용된 "단일-모델 집단분포"는 대부분 리포좀이 평균 입자크기를 포함하는 입자크기 범위내에 입자크기를 가진다는 의미이다. "평균입자크기"란 각 리포좀 집단의 직경의 합을 리포좀 평균수로 나눈 것을 의미한다.

<36> 평균 입자크기는 제조공정이 시작되기전에 선택될 수도 있고 평균 입자크기를 포함하는 리포좀 집단을 생성하기 위한 공정전에 선택될 수도 있다. 따라서 본원 발명에 따라 리포좀을 만드는 공정은 미리 선택된 평균입자 크기를 포함한느 단일-모델 집단 리포좀을 얻는다. 이 공정은 리포좀 생산에 요구되는 생산후 크기분류 과정의 필요성을 완전히 제거하거나 또는 상당히 경감시킨다.

<37> 이와 같은 본 발명은 리포좀 생산을 위한 전술한 공정에 많은 다양한 변수중 세가지가 이 공정에 의해 생상된 리포좀의 크기 분포를 결정하는데 매우 영향을 준다. 이와 같은 세가지 주요변수는 1) 혼합장치의 관련 속도; 2) 유기와 수용성 상의 혼합물에서 용매를 제거하기 위한 비활성 기체의 흐름속도(즉, 살포속도); 3) 혼합물의 온도(즉, 반응온도)이다. 본 발명자는 변수의 적절한 선택에 의해 미리 선택된 평균 입자크기를 포함하는 단일-모델 집단분포를 가지는 리포좀 집단이 수득될 수 있는 것과 같이 이와 같은 세개변수 사이의 상관관계를 결정하였다.

<38> 리포좀 크기분포는 다음과 같은 방식으로 이들 세가지 주요변수에 의해 일반적으로 영향을 받는다. 혼합속도 또는 반응온도가 증가할때 리포좀의 크기는 일반적으로 감소된다. 역으로 살포속도가 증가하면 리포좀의 크기는 일반적으로 증가한다. 따라서, 최대 광범위한 편에서 리포좀 생산을 위한 본 발명의 공정은 소요의 평균 리포좀 크기를 선택하고, 물과 혼합될 수 없는 용매내에 양쪽성 지질으로 구성된 유기상을 생활성제를 선택적으로 포함한 수용성 상과 복잡하고, 리포좀의 소요 평균입자크기에 따라 미리 선택된 혼합속도, 살포속도와 반응온도에서 복합상을 혼합한다. 특정구체예에서, 용매와 성분의 수용성상 용적비는 3:1 이하이고 공정은 지질물질이 가장 잘 적응할 수 있는 pH 범위인 5.5 내지 7.5 에서 실행한다.

<39> 본 발명의 공정은 생산된 리포좀과 생활성제를 연합시키는 것으로 구성된다. 본 기술에 숙지된 자는 생활성제(가령, 친지성 그리고 또는 친수성 약물)가 리포좀 제조동안에 또는 리포좀이 형성된 후에 리포좀내에 적하된다. 적절하게는 생활성제는 아미노글리코시드 항생제로 이의 유사체, 혼합물 또는 유도체를 포함한다. 적절하게는 아미노글리코시드는 젠타마이신, 스트렙토마이신, 디하이드로스트렙토마이신, 토브라마이신, 네오마이신, 파로마이신, 리보스타마이신, 리비도마이신, 카나마이신, 비오마이신, 시소미신, 네틸미신과 아미카신에서 선택될 수 있다. 더욱 적절하게는 아미노글리코시드는 젠타마이신이다.

<40> 복합된 유기용매와 수용성상은 리포좀 생산에 충분한 혼합속도, 비활성 기체유속과 반응온도를 포함한 공정조건하에 반응 용기내에서 진행된다. 미리 선택된 혼합속도, 살포속도와 반응온도는 다음의 식에 따라 선택될 수 있다:

$$y = B_0 + B_1X_1 + B_2X_2 + B_3X_3 + B_{12}X_1X_2 + B_{13}X_1X_3 + B_{23}X_2X_3 + B_{11}X_1^2 + B_{22}X_2^2 + B_{33}X_3^2$$

(1)

<42> 이때:

<43> Y = 소요 평균 입자크기

<44> X1 = 혼합속도

<45> X2 = 비활성 기체 유속

<46> X3 = 반응온도

<47> Bo =상수

<48> 그리고, B1,B2,B3,B12,B13,B23,B11,B22,B33은 표1에 따라 복귀상수를 나타낸다.

표 1

상수	기능
B0	절편
B1	혼합의 주요효과
B2	비활성 기체 유속의 주요효과
B3	반응온도의 주요효과
B12	혼합속도와 비활성 유속 사이의 주요인자 상관관계
B13	비활성 기체 유속과 반응온도 사이의 주요인자 상관관계
B23	혼합속도의 2차 효과
B11	비활성 기체 유속의 효과
B22	반응온도의 2차효과

<50> 적절하게는 비활성 기체 유속은 약 0.4 1/min 내지 약 1.2 1/min 이고 반응온도는 20℃ 내지 80℃ 이고 혼합속도는 최고 2000rpm 이다. 공정은 리포좀의 서요 평균 입자크기를 선택하고; 식(1)에 따라 공정조건의 상관관계 기초하에 공정조건의 각 값을 선택하고; (b)단계에서 선택된 값에 기초하여 식(1)에서 계산된 평균 입자크기를 결정하고; 계산된 평균 입자크기와 소요의 평균 입자크기를 비교하고, 그리고 충분히 유사한 경우, 유기상과 수용상을 복합하고; 그리고 (b)단계에서 선택된 공정조건하에 복합된 유기상과 수용상을 진행하는 것으로 구성된다. 계산된 평균 입자크기와 소요의 평균입자 크기가 충분히 유사하지 않는 경우에, 새로 계산된 평균 입자크기는 식(1)에 명시된 공정조건들중 적어도 하나를 변화시킴으로써 얻을 수 있고 이때 나머지 조건을 일정하게 유지시켜 충분히 유사한 새로운 계산된 평균 입자크기가 얻어질때까지 지속한다. 적절하게는 비활성 기체 유속은 매우 다양하게 변화시키면서 혼합속도와 반응온도는 일정하게 유지시킨다. 그러나, 계산된 그리고 소요의 평균 입자크기가 여전히 유사하지 않는 경우에는 비활성 기체 유속과 혼합속도를 모두 적절히 변화시키면서 반응속도는 일정하게 유지한다. 적절하게는 유기상 대 수용성상 비(용적/용적)은 0.2:1 내지 1.0:1 이고 복합된 수용성상과 유기상의 pH 는 5.5 내지 7.5 이다.

<51> 이와 같은 공정조건하에 생산된 리포좀은 수용성 각부분에 포획된 용질로 구성된 다층라멜라 리포좀이고 이때 각 수용상에 용질농도는 실제 동일하다. 가장 적절한 아미노글리코시드 항생제 젠타마이신인 생활성제는 리포좀과 연합될 수 있다. 본 발명은 여기에서 제시하는 공정에 의해 생성된 리포좀을 제공하는 것이다.

<52> 공정은 반응용기내에 고정동안에 복합된 수용성과 유기상이 점성겔을 형성할 시점에 종료될 수 있다. 생활성제, 적절하게는 아미노글리코시드 항생제, 가장 적절하게는 젠타마이신은 겔형성전, 동안 또는 형성후에 겔과 연합될 수 있다. 이와같은 공정에서 생성된 겔은 또한 여기에 제공하고 온혈동물, 적절하게는 사람에 감염의 예방 및 치료를 위해 항생제의 항-감염효과량을 포함한 겔을 이용하여 국소적으로 응용할 수 있다. 적절하게는 항생제는 젠타마이신이다.

<53> 또한, 생활성제, 지질로 구성된 지질 이중층, 안정도를 강화하는 pH 를 가지는 수용성 용액으로 구성된 격실부분으로 구성된 저장-안정한 리포좀을 제공하는데 이때 지질은 실제 순수한 지질이다. 적절하게는 리포좀은 다층라멜라 리포좀이고; 다층 라멜라 리포좀은 각 수용성 격실내에 포획된 용질로 구성되고 이때 각 수용성 격실내에 용질농도는 실제 동일하다. 적절한 생활성제는 아미노글리코시드 항생제로 아미노글리코시드는 젠타마이신, 스트렙토마이신, 디하이드로스트렙토마이신, 토브라마이신, 네오마이신, 파로마이신, 리보스타마이신, 리비도마이신, 카나마이신, 비오마이신, 시소미신, 네틸미신과 아미카신에서 선택될 수 있다. 더욱 적절하게는 이미노글리코시드는 젠타마이신이다.

<54> 적절하게는 실제 순수지질은 적어도 85% 순도, 더욱 적절하게는 적어도 90% 순도, 가장 적절하게는 약 95% 순도를 가진다. 일반적으로, 실제 순수지질은 리소리피드가 없다. 적절하게는 지질의 약 5% 미만이 리소리피드이고, 더욱 적절하게는 2% 미만이된다. 적절하게는 실제 순수지질은 인지질로 계란 소프타티딜클린(EPC)이다. 일반적으로 본 발명의 저장 안정한 리포좀에서 생활성제에 대한 지질의 비율(w/w)은 적어도 1:20; 바람직하게는 생활성제에 대한 지질의 비(w/w)는 1:5 내지 1:15 이고 좀더 바람직하게는 생활성제에 대한 지질의 비율은 1:10 이다.

<55> 일반적으로, 저장-안정한 리포좀에 수용성 용액은 염용액이다. 바람직하게는, 수용성 용액의 안정화 증가 pH 는 5.5. 내지 pH 7.5이다. 좀더 바람직하게는 안정화 증강 pH 는 약 6.5 이다.

<56> 따라서, 본 발명의 적절한 구체예에서, 저장에 안정한 리포좀은 아미노글리코시드 항생제, 실제로 순수한 에그 포스파티덜클린과 pH 가 약 6.5 인 수용성 염용액으로 구성되고, 이때 리포좀은 이의 수용성 격실내에 포획된 용질로 구성된 다층라멜라 리포좀이고 다층라멜라 리포좀의 각 격실내에 용질의 농도는 실제 동일하며 에그 포스파티덜클린은 적어도 85% 순도를 가지고 실제 리소리피드가 없으며, 젠타마이신 대 EPC 의 비율(w/w)은 1:15 내지 1:5 가 된다. 적절하게는 아미노글리코시드 항생제는 젠타마이신, 아미카신 또는 토브라마이신이고 가장 적절한 항생제는 젠타마이신이다.

<57> 본 발명에 따르면, 다층라멜라 리포좀은 기존 발명과 비교할때 더적은 양의 용매를 사용하고, 더 나은 pH 조건을 이용하여 미리 선택한 평균 입자크기에 기초하여 형성된다. 본 발명의 공정은 유기상과 수용상이 적어도 3:1 의 비율로 적절하게는 1:1 의 비율로 복합되어 이중상 혼합물을 형성하게 된다. 용매를 제거하기 위해 사용되는 유기용매의 양이 적을수록 바람직하다. 그러나, 약 0.13:1 의 최저 용적비가 적절한 약물 포획을 얻는데 필요하며 더욱 적절하게는 0.20:1 이된다. 일반적으로 소요의 리포좀 생성물을 생산하기 위해 유기용매의 최저량이 사용된다. 기존 방법 보다 더적은 양의 용매를 사용하기 때문에 이용되는 비활성 기체의 전반적인 용적과 살포작동의 총 시간이 감소될 수 있다.

<58> 이중상 혼합물은 리포좀을 생산하기에 충분한 상태하에 진행된다. 수용액의 pH 는 리포좀을 준비하는데 사용되는 하나이상의 지질과 적응할 수 있는 pH 로 조정한다. 여기에서 "적응하는"온 수용액의 pH 를 말하는 것으로 용액이 리포좀내에 포획되었을때 리포좀이 장시간 저장될때 지질산화를 최소화시킬 수 있는 용액의 pH 를 의미한다. 일반적으로 수용상의 pH 는 5.5 내지 7.5, 적절하게는 6.5 이다. 수용상의 pH 는 수산화나트륨, 염산과 같은 산과 염기를 포함하는 pH 조절제의 적정량을 첨가하여 소요의 범위내에 유지시킨다.

<59> 적절하게는 다층라멜라 리포좀은 각 수용성 격실내에 포획된 용질로 구성되고, 각 수용성 격실내에 용질의 농도는 실제 동일하며 가령 다층라멜라 리포좀은 라멜라간 용질분포가 실제 동일하다. 이와 같은 리포좀은 라멜라간 용질분포가 실제 상이한 리포좀인 "보통의" 다층 라멜라 리포좀 보다 수용성격실 사이에서 더적은 삼투압을 가지므로 따라서 일반적으로 더 안정하다.

<60> 본 발명에 사용된 지질은 약쪽성이다. 친수성은 인, 카르복실, 황, 아미노, SH, 니트로와 다른 유사기의 존재가 분자에 부여된다. 소수성은 긴-사슬 포화된 그리고 불포화된 지방산 탄화수소기의 포함을 일컫고 이때 하나이상의 방향족, 고리지방족 또는 이형고리기에 의해 치환될 수 있는 기도된다. 적절한 양쪽성 화합물은 포스파티딜클린, 포스파티딜에탄올아민, 리소포스파티딜클린, 리소포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜세린, 포스파티딜이노시톨, 포스파딘산, 포스파티딜글리세롤등과 같은 포스파티딜 글리세리드이다. 디미리스토일 포스파티딜콜린, 디팔미토일포스파티딜콜린 또는 디스테아로일 포스파티딜콜린과 같은 합성포화 조성물과 디올레일 포스파티딜콜린 또는 디이놀레일 포스파티딜콜린과 같은 불포화종이 사용될 수 있다. 가령, 글리코리피드와 글리코스핑고 리피드가 역시 이용될 수도 있다.

<61> 다양한 클레스테롤과 다른 스테롤 그리고 이의 수용성 유도체는 리포좀 형성에 사용될 수도 있다(가령, 미국특허 4,891,208 와 5,100,569) 적절한 기로는 미국특허 4,891,208 에 기술된 클레스테롤 헤미숙시네이트이다. 토코페롤 헤미숙시네이트와 같은 특정 수용성 토코페롤 유도체가 미국특허 5,041,278 에 기술된 것과 같이 리포좀을 형성하는데 또한 사용될 수도 있다.

<62> "수용상"은 친수성 생활성제와 같이 용액에 수용성 성분을 포함하거나 또는 현탁액, 또는 이의 혼합물에 다른 성분들을 포함하는 수용계 혼합물이다. "유기상"은 친지성 생활성제와 같은 용매와 현탁액내에 다른 성분을 포함한 물과 섞이지 않는 유기용매 혼합물이다. 일반적으로 리포좀을 만드는데 사용된 지질은 유기상에 용해된다.

<63> 지질을 녹이는데 사용되는 용매는 일반적으로 물과 섞이지 않는다. 이와 같은 용매에는 메틸렌 클로라이드, 클로로포름, 디에틸에테르, 플로오르카본, 클로로플로로카본등이 포함되나 이에 국한시키지 않는다.

<64> 리포좀 형성공정을 실행하기전에 소요의 평균입자크기를 선택하고 이는 리포좀에 어떤 물질이 결합되는지 또는 리포좀의 최종농도에 따라 전적으로 결정된다. 가령, 젠타마이신이 리포좀에 결합되는 경우 일반적인 평균 입자크기는 약 200nm 이다. 리포좀 또는 점성겔 중간 생성물을 형성하기 위해 필요한 성분은 다음과 같은 방식으로 결합된다. 양쪽성 지질 또는 지질혼합물은 유기상의 형성하기 위해 물과 혼합되지 않는 유기용매에 녹인다. 소요의 평균입자크기를 선택한 후에, 유기상은 수용상에 첨가될 수도 있다. 그다음 혼합물은 도면1에 나타낸 것과 같은 형태의 반응용기내에서 진행된다. 도면1에 따르면, 공정공간(6)을 한정하는 반응기(4)를 포함하는 시스템(2)이다. 이때 유기와 수용성상은 본 발명에 따라 함께

혼합된다. 반응기에는 혼합시스템(8), 살포시스템(10)과 가열/냉각시스템(12)이 있다.

<65> 반응기(4)는 리포좀을 만들기 위해 필요한 수용성상과 유기상이 복합되는 공간(6)을 한정하고 리포좀 또는 점성겔 중간물질의 실제공정이 일어난다. 반응기는 수용성상과 유기상을 실제 흡수하지 않고 깨끗하고 안정한 물질로 만들어진다. 적절한 물질로 유리와 스테인레스 스틸이 있다.

<66> 반응기(4)에는 반응기(4)의 림(16)과 밀봉 연결되어 위치하기에 적합한 덮개(14)가 갖추어져 있다. 덮개는 반응기(4)에 덮개(14)를 씌우거나 벗기기 위해 핸들(18)을 가진다.

<67> 덮개(14)에는 반응기(4)내에 혼합시스템(8)과 살포시스템(10)을 유지시키기 위한 구멍(19)(20)이 각각 있다. 도다른 구멍(22)은 진행 공정공간(6)내에 반응온도를 감지하기 위해 온도계와 같은 열측정수단을 매달아두기에 적합하다.

<68> 혼합시스템(8)에는 덮개(14)의 구멍(19)을 통하여 공정공간(6)에 매달려 있는 축(24)이 포함된다. 축(24)은 모터(나타내지 않은)에 연결된다. 모터는 본 발명에 따른 소요의 속도로 회전할 수 있도록 축에 충분한 힘을 제공할 수 있다.

<69> 축(24)의 비닥부분에 작동식으로 연결된 것이 혼합임펠러(26)이다. 임펠러는 축에 의해 회전하고 따라서 소요의 리포좀을 형성하기 위해 필요한 정도로 수용성상과 유기상을 혼합하게된다. 혼합 임펠러(26)는 도면1과 2에 나타낸 것과 같이 상이한 모양의 날 또는 특정모양 이외에 날의 수를 달리하는 것과 같이 다양한 모양을 가질 수 있다. 적절하게는 임펠러(26)는 수용성상과 유기상의 완전한 혼합을 위해 반응기(4)의 내용물에 측 또는 방사형 유동을 발생시킨다. 반응기벽에 상당히 근접하게 뻗어있는 날을 가지는 측믹서와 같은 다른 혼합장치가 본 발명에 이용될 수도 있다.

<70> 도면2에 가장잘 나타난 임펠러(26)에는 축(24)을 수용하기 위한 구멍(32)을 가지는 허브(30)에 부착된 한쌍이상의 반대쪽 날(28a-28d)를 포함한다. 임펠러(26)는 세트 스크루와 같은 통상수단에 의해 축(24)에 연결되어 회전하게 된다.

<71> 도면2에 특별히 제시한 임펠러는 두쌍의 날(28a,28b,28c,28d)을 가진다. 하나이상의 날은 축(24)의 종축에 평행하게 위치하거나 또는 일정각으로 기울어져 있다. 도면2의 구체예에서 볼수 있는 것과 같이 각 날(28)은 반응기(4)의 내용물로 날이 통과할 수 있도록 45° 각으로 기울어져 있고 도면1에서 나타낸 반응기 내용물(화살표로 표시함)의 축방향 흐름을 발생시키게 되고 특히 점성 겔 형성(즉 선-리포좀 단계)시에 일어나게 된다.

<72> 날(28a-28d)는 원하는 경우 좀더 급격사로 설치될 수도 있다(즉, 축(24)의 축에 대해 측정한 경우 45° 이하). 더 급한 각을 이룰경우 임펠라에 대한 반응기 내용물의 저항을 더커진다. 이와 같은 저항은 더큰 힘을 발생하는 모터를 이용하므로써 축(24)의 토크를 증가시켜 극복할 수 있다. 또한, 각의 변화는 임펠라에 의해 만들어지는 즉 축흐름(45° 각)에서 방사흐름(축에 평행)으로 변화하게 된다. 임펠라(26)가 축(24)에 고정되어 있기 때문에 축(24)의 회전은 분당 동일한 속도의 회전에서 임펠라 날을 회전시키게 된다.

<73> 도면1에 나타낸 살포시스템(10)에는 한단부에 비활성 기체원(가령, 질소기체, 아르곤기체등, 나타내지 않음)에 연결된 튜브(34)를 포함한다. 튜브(34)에는 진행공간(6)의 바닥쪽으로 하방향 뻗어있는 중앙부분(36)을 포함한다. 튜브의 꼬리부분(38)은 진행공간(6)의 바닥 중앙쪽으로 중앙부분(36)에 직각으로 뻗어있다. 도면1에 나타낸 구체예에서 꼬리부분(38)은 반응기 내용물 속으로 기포형으로 비활성기체는 분배하기 위한 하나이상의 구멍(42)을 가지는 상측으로 이어진 노즐(40)이 있다. 튜브(34)의 꼬리부분(38)에는 노즐(40)에 추가하여 또는 노즐위치에 비활성기체를 분배하기 위한 하나이상의 구멍(45)이 있다.

<74> 반응기(4) 내용물에 비활성기체의 살포는 유기용매를 제거하게 한다. 비활성기체는 용매를 포획하고 반응기(4)내에 기압을 변화시켜 출구포트(54)를 가지는 튜브(52)를 통하여 반응기 밖으로 휘발성 용매를 끌어내게 된다.

<75> 냉각/가열시스템(12)에는 소스(나타내지 않음)에서 비-복귀밸브(46)를 통하여 가열된/냉각된 유체(즉, 물)를 수용하기 위한 재킷(44)을 포함한다. 재킷(44)은 반응기 내용물의 조절된 가열/냉각을 제공하기 위해 반응기(4)부분을 에워싸게 된다. 유체는 재킷(44)으로부터 비-복귀밸트(48)을 경유하여 제거되고 다시 순환되거나 또는 버려진다.

<76> 반응기내에 온도는 온도계를 포함하는 통상의 온도 측정장치에 의해 측정된다. 터모커플은 반응온도에 상응하는 시그날을 전달하는 온도-감지 프로브로 디지탈 디스플레이 스크린과 같은 디스플레이 수단에 나타나는 전기적 시그날을 해석한다. 냉각/가열 시스템에 공급되는 유체온도는 소요의 반응온도에 기초하여 선택될 수 있다.

<77> 반응기는 진행조건, 특히 혼합속도, 살포속도와 온도를 선택함으로써 작동되고 이는 미리 선택된 평균 입자크기를 제공한다. 도면1과 2에 나타낸 장치에서 혼합속도는 임펠라(26)의 회전속도이고 이는 축(24)의 분단회전수(rpm)에 상응한다. 살포속도는 시간당 용기내용물에 살포된 비활성기체의 용적으로 정의되고 일반적으로 1/min 으로 측정한다. 도면1에 나타낸 반응기 온도는 온도계(50)에 의해 측정된 공간(6)내의 온도가 된다.

<78> 변수들의 각 값이 일단 선택되면 평균입자크기는 식(1)을 이용하여 계산한다:

$$y = B_0 + B_1X_1 + B_2X_2 + B_3X_3 + B_{12}X_1X_2 + B_{13}X_1X_3 + B_{23}X_2X_3 + B_{11}X_1^2 + B_{22}X_2^2 + B_{33}X_3^2$$

<80> 이때:

<81> Y = 소요 평균 입자크기

<82> X1 = 혼합속도

<83> X2 = 비활성 기계 유속

<84> X3 = 반응온도

<85> Be = 상수

<86> 그리고, B1,B2,B3,B12,B13,B23,B11,B22,B33은 표1에 따라 복귀상수를 나타낸다.

표 1

상수	기능
Bo	절편
B1	혼합의 주요효과
B2	비활성 기체 유속의 주요효과
B3	반응온도의 주요효과
B12	혼합속도와 비활성 유속 사이의 주요인자 상관관계
B13	비활성 기체 유속과 반응온도 사이의 주인자 상관관계
B11	혼합속도의 2차 효과
B22	비활성 기체 유속의 효과
B33	반응온도의 2차효과

<89> 적절하게는 비활성 기체 유속을 약 0.4 1/min 내지 약 1.2 1/min 이고 반응온도는 20℃ 내지 80℃ 이고 혼합속도는 최고 2000rpm 이다.

<90> 선택된 평균 입자크기는 소요의 평균 입자크기와 비교한다. 계산치와 예상치가 동일하거나 또는 충분히 유사하면 진행 시스템은 주요변수에 대해 선택된 값으로 작동된다. "충분히 유사함"은 본 발명의 기술에 숙지된자가 최종 리포좀을 유도하는 안자를 포함하여 결정한 유사성을 포함한다. 이것은 다른 변수는 일정하게 유지시키면서 변수중 하나는 선택된 범위내에서 변화시켜 실시할 수 있다. 변화의 범위는 공정의 한정과 여기에 사용된 장치에 의해 결정된다.

<91> 본 발명의 적절한 방법에서 반응온도와 혼합속도는 초기에는 일정하게 유지시키고 살포속도를 변화시킨다. 제2변수가 변화해야하는 경우 혼합속도를 다양하게 함으로써 반응온도는 일정하게 유지시키는 것이 적절하다. 그러나 혼합속도는 최대 혼합속도에 의해 일반적으로 제한받는다. 따라서 혼합속도와 변화가 계산치와 이상치 사이의 소요의 유사도의 성취없이 혼합시스템의 최대한도에 도달하는 경우 반응온도를 변화시켜야 한다. 변수들의 변화는 계산치가 이상치와 동일하거나 유사해질 때까지 지속된다.

<92> 일단 이사영 평균 입자크기가 계산되면 수용성상과 유기상은 이중상 혼합물을 형성하기 위해 복합된다. 가령, 공정이 세개 필터반응기를 이용하는 경우에 다음과 같이 진행된다. 더 크거나 더 작은 반응기를 사용하는 경우 일반적 변수는 주요변수범위내에서 결정될 수 있음을 알것이다. 선택적 생활성제의 유무에 관계없이 수용상(즉 시트레이트 완충용액)은 반응기에 첨가된다. 혼합장치는 최고, 2,000rpm 범위까지 미리 선택된 혼합속도에서 작용한다. 유기용매(즉 메틸렌클로라이드)에 용해된 지질(즉 에그포스파티딜콜린과 콜레스테롤)로 구성된 유기상을 혼합장치에 의해 교반하면서 수용상에 첨가된다. 비활성기체는 튜브(34)를 통하여 제공하고 0.04 내지 1.2 1/min 의 미리 선택된 살포속도에서 반응용기내로 살포된다. 일단 살포가 시작되면 반응기의 온도는 재킷(44)을 통하여 가열된 물이 통과함으로써 20 에서 80℃로 상승한다. 그러나 더 냉각된 온도는 재킷(44)을 통하여 냉각수를 통과시키므로써 사용될 수 있다.

<93> 본 발명의 공정은 다중라멜라 리포좀과 생활성제의 연합단계로 구성된다. "생활성제"는 동물내에 일부 생물학적 활성을 가지는 물질의 성분물이 될수 있다. 생화설제에는 핵산, 폴리뉴클레오티드, 항균조성물, 항생제, 항-바이러스 조성물, 항공팡이 조성물, 항기생층 조성물, 종양파괴 조성물, 단백질, 독소, 효소, 호르몬, 실경전단물질, 당단백질, 이뮤노글로블린, 면역조절제, 염분, 방사능 라벨, 방사능 불투과 조성물, 형광 조성물, 폴리사카라이드, 세포수용체 결합성분물, 국소마취제등이 포함되나 이에 한정 시키지는 않는다(Lenk et al., U.S. Patent No. 4,522,803; Fountain et al., U.S. Patent No. 4,588,578; Janoff et al., U.S. Patent Nos. 4,861,580 and 4,897,384; and Lenk et al., U.S. Patent No. 5,082,664). 여기에서 사용된 "연합"이란 수용성 부분에 생활성제의 포획을 의미하거나 또는 지질이중층 내면 또는 외면에 연합을 의미한다.

<94> 본 발명의 공정에 따라 접성겔 중간 생성물이 생성될 수 있다. 공정에서 흐린지질 현탁액은 유기상과 수용상이 복합되고 용매가 제거되기전에 일반적으로 생성된다. 충분한 용매가 리포좀을 형성하기 위해 제거되기전에 지질물질과 연합된 물의 양은 리포좀 형성하기에는 여전히 너무 적고 충분한 용매가 제거되어 남아있는 용매양에 용해될 수 있는 지질에 초과되는 지질이 남아있게 되고 지질은 겔형의 불충분한 이중층을 형성한다. 생성된 점성겔은 리포좀의 전구체이다.

<95> 점성겔의 형성은 유기와 수용성상이 3:1 이하의 용적비로 복합될때 발생한다. 점성겔은 0.13:1와 같이 낮은 용적비에서 즉시 형성됨을 발견하였다. 0.13:1 용적비 이하에서 지질물질은 점성겔을 형성하기 위해 특이적으로 진행되어야 하는 구형을 형성하는 경향이 있거나 또는 겔이 전혀 형성되지 않는다. 가령, 구는 서로 떨어뜨리기 위해 혼합속도를 상승시켜 처리한다. 점성겔은 0.13:1 이하의 용적비로 형성되고 적절하게는 유기상대 수용상 용적비가 적어도 0.13:1 적절하게는 0.2:1 내지 1:1 이 바람직하다.

<96> 생활성제를 진행전 또는 동안에 유기상 또는 수용상에 첨가되는 경우 점성겔이 생활성제와 연합하게 된다. 이의 특징적인 불충분한 지질이중층 때문에 점성겔은 생활성제 일부만을 포획하고 나머지 일부는 지질물질에 의해 포획되지 않은채 연합하게 된다. 이와 같은 조건은 "겔-연합된" 것이라 칭하고 이 의미는 생활성제가 리포좀의 지질 또는 수용성 부분내에 포획된 또는 리포좀의 외면에 흡수된 것과 같은 것을 포함한 겔의 일부가 된다. 이것은 감염치료를 위한 생활성제의 국소투여를 위한 소요의 생성물을 의미한다.

<97> 제3도에는 본 발명에 따라 생성된 점성겔의 전자현미경도이다. 현미경의 하단중앙에 불충분하게 수화된 지질이중층의 지질물질의 층을 나타낸다.

<98> 점성겔은 온혈동물 특히 사람에 감염의 예방 또는 치료방법에 사용되는데 이때 겔은 항생제의 항-감염효과량으로 구성되고 투여는 국소투여가 된다. 가령, 점성겔은 상처부위에 칠함으로써 제공될 수 있다. 상처는 외과적 과정에 의해 선택적으로 닫을 수 있다. 점성겔과의 연합에 특히 적절한 것은 젠타마이신 C1, C1a 와 C2 를 포함하는 젠타마이신, 스트렙토마이신, 디하이드로스트렙토마이신, 토브라마이신, 네오마이신, 파로마이신, 리보스타마이신, 리비도마이신, 카나마이신(카나마이신 A 와 B 포함), 비오마이신, 시소미신, 네틸미신과 아미카신과 같은 아미노글리코시드 항새제에서 선택될 수 있다. 더욱 적절하게는 아미노글리코시드는 젠타마이신이다.

<99> 상처가 감염되기 시작할때 상처부위에 호중구, 대식세포와 면역시스템의 다른 세포들이 방대하게 침투된다. 이와 같은 세포형은 지질물질을 파괴하는 다양한 효소를 분비하여 겔 연합된 아미노글리코시드가 상처부위로 서서히 방출되게 한다. 또한 호중구와 대식세포의 침투는 점성겔을 삼키고 이는 세포내로 아미노글리코시드가 방출되게 하게 이에 따라 국소침투와 싸우는 면역시스템을 돕게된다. 점성겔이 일반적인 리포좀의 구조적 조직을 갖지 않기 때문에 겔-연합된 생활성제는 상처 부위에서 더 빨리 이용할 수 있다.제조물의 투여방식은 성분물이 수송될 부위와 세포에 따라 결정된다. 소요투여 과정과 표준 제약학적 실행과정에 따라 선택된 염과 같은 제약학적 담체와 혼합하여 투여될 수 있다. 본 발명의 제조물은 보통의 외과과정에 의해 상처부위를 봉하기전에 상처부위에 국소적으로 투여될 수 있다. 점성겔은 이 투여를 개선시키기 위해 점성조절제(예로 폴리사카라이드)와 같은 첨가제와 복합될 수 있다. 제조물의 특정 성질에 따라 본 기술에 숙지된 자에게는 다른 용도로 고려할 수 있다.

<100> 항생제의 "항-감염 효과량"은 항생제의 치료요법적 효과량으로 즉, 감염의 성립, 성장 또는 퍼짐을 저해하는데 충분한 양으로 물리적 또는 생리학적 반응을 얻게된다. 주어진 아미노글리코시드의 효과량은 투여방식, 수용자의 특징, 표적세균의 민감성과 다른 공지된 인자에 따라 다양해질 수 있다. 겔-연합된 생활성제 양은 수용성 또는 유기상에 제제의 용해도에 따라 달라진다. 가령, 젠타마이신은 수용성상의 최대 850mg/ml 의 용해도를 가진다.

<101> 질병상태의 치료처리에 사람에 투여시, 처방의사는 주어진 환자에 대해 적정약량을 최종적으로 결정해야 하는데 이는 나이, 체중, 개인 반응뿐 아니라 환자의 질병특정과 심각성에 따라 매우 다양해진다. 점성겔에서 약물의 약량은 약물만 이용한 경우와 비슷하게 된다. 그러나 어떤 경우에는 이 제한선을 넘은 약량의 투여가 필요할 수도 있다.

<102> 질병상태의 치료처리에 사람에 투여시, 처방의사는 주어진 환자에 대해 적정약량을 최종적으로 결정해야 하는데 이는 나이, 체중, 개인반응뿐 아니라, 환자의 질병특정과 심각성에 따라 매우 다양해진다. 점성겔에서 약물의 약량은 약물만 이용한 경우와 비슷하게된다. 그러나 어떤 경우에는 이 제한선을

넘은 약량의 투여가 필요할 수도 있다.

<103> 여기에서, 제공되는 저장 안정한 리포좀은 생활성제, 지질과 안정성 강화 pH 를 가지는 수용액을 포함하는 격실로 이루어진 지질이중층으로 구성되고 이때 지질은 순수지질이다. "저장안정한" 리포좀은 장시간동안에 최소의 지질 가수분해와 산화를 포함한 리포좀의 구조 또는 성질의 최소한 파괴와 동시에 리포좀과 연합한 또는 이에 포획된 생활성제의 누출을 포함한 리포좀 내용물의 최소누출이 되는 리포좀을 말한다. 리포좀은 최고 2년이상 저장에 안정하다. 리포좀 저장은 일반적으로 4-5℃ 의 냉장상태에서 실시되나 필요한 경우 다른 조건이 이용될 수도 있다. 저장 안정한 리포좀을 형성하는데 사용되는 수용액의 pH 과 이를 포함하는 리포좀은 저장동안에 리포좀을 안정하게 하는데 공헌하고 실제 지질 가수분해와 산화의 저지함으로써 유지시켜 준다.

<104> 적절하게는, 리포좀은 다층라멜라 리포좀으로 적절하게는 다층 라멜라 리포좀은 격실내에 포획된 용질로 구성되고 각 격실내의 용질농도는 실제 동일하며 즉, 다층라멜라 리포좀은 실제 라멜라간 용질분포가 동일하다. 이와 같은 리포좀은 Lenk et al. (U.S. Patent No. 4,522,803, 5,030,453 and 5,169,63, Fountain et al. (U.S. Patent No. 4,5885,578) and cullis et al. (U.S. Patent No. 4,975,282)에 상술된 과정에 의해 형성될 수 있다. 실제 동일한 라벨라 층간 용질분포는 다층 라멜라 리포좀의 안정성을 강화시켜 주는데 이는 수용성 격실간에 강화된 삼투균형과 감소된 삼투압으로 인한것 같다. "보통"MLVs" 는 실제 라멜라층간 용질분포가 동일하지 않기 때문에 격실 사이에 더큰 삼투압력을 가지므로 덜 안정하다.

<105> 본 발명의 저장 안정한 리포좀은 리포좀내에 또는 연합하여 생활성제를 포함한다. 동물에서 일부 생물학적 활성을 가지는 물질인 생활성제에는 헥산, 폴리뉴클레오티드, 항균 조성물, 항생제, 항-바이러스 조성물, 항곰팡이 조성물, 항기생충 조성물, 종양파괴 조성물, 단백질, 독소, 효소, 호르몬, 신경전달물질, 당단백질, 이뮤노글로블린, 면역조절제, 염료, 방사능 라벨, 방사능 불투과 조성물, 형과 조성물, 폴리사카라이드, 세포수용체 결합성분물, 국소마취제등이 포함되나 이에 한정시키지는 않는다(Lenk et al., U.S. Patent No. 4,522,803; Fountain et al., U.S. Patent No. 4,588,578; Janoff et al., U.S. Patent Nos. 4,861,580 and 4,897,384; and Lenk et al., U.S. Patent No. 5,082,664). 여기에서 사용된 "연합"이란 수용성 부분에 생활성제의 포획을 의미하거나 또는 지질이중층 내면 또는 외면에 연합을 의미한다. 적절한 생활성제는 이미노글리코시드 항생제로 젠타마이신, 스트렙토마이신, 디하이드로스트렙토마이신, 토브라마이신, 네오 마이신, 파로마이신, 리보스타마이신, 리비도마이신, 카나마이신, 비오마이신, 시소미신, 네틸미신과 아미카신에서 선택될 수 있다. 더욱 적절하게는 아미노글리코시드는 젠타마이신 이다. 또다른 구체예에서는 항생제는 아미카신이다. 또다른 구체예에서는 항생제는 토브라미신이다.

<106> 실제 순수지질은 적어도 85% 순수지질과 약 15% 지질 파쇄물과 다른 지질로 구성된다. 더욱 적절하게는 적어도 90% 순도, 가장 적절하게는 약 95% 순도를 가진다. 지질순도는 본 기술분야에 숙지된 자에 공지된 다양한 방법에 의해 결정되고 205nm 에서 UV 감지를 이용하여 HPLC 와 같은 실험없이 실행될 수 있다(가령, U.S. Serial No. 08/__, filled March 14, 1994, U.S. Serial No. 07/512,557, filed Aprill 12, 1990; and S. Frokjaer et al., "Stability Testing of Liposomes During Storage," in:liposome Technology, Volume 1:Preparation of Liposomes G. Gregoriadis ed.), CRC Press, Boca Raton, FL (1984), pp. 247-258).

<107> 적절하게는 실제 순수지질은 리소리피드 없다. 리소리피드는 머리기와 하나의 아실사슬이 있는 양쪽성 지질이고 이는 디아실 지질의 가수분해 결과로써 지질 이중층에 있다. 따라서 리소리피드 형성은 지질의 측정이 되고 리소리피드는 리포좀을 불안정하게되고 이는 리소리피드는 겔에서 더 안정하여 겔을 형성하는 경향이 있다. 지질 이중층에 디아실 지질에서 리소리피드의 형성은 이의 침투성과 같은 이중층에서 변화를 유도한다. 따라서, 실제 리소리피드가 없는 리포좀성 이중층은 이와 같은 지질의 중요한 성질을 포함하는 이중층 보다 더 안정하다. 리소리피드의 "실제없는"은 리피드의 5% 미만이 리소리피드 적절하게는 2% 미만이 된다.

<108> 적절하게는 순수지질은 인지질로 구성되고 적절하게는 에그포스파티딜클린 (EPC)이다. 지질은 콜레스테롤, 콜레스테롤 헤미숙시네이트(CHS)와 같은 스테롤 유도체와 알파-토코페롤 또는 이의 유도체 이외의 다른 인지질, 양쪽성 지질로 구성된다.

<109> 실제 지질 순도는 지질 가수분해와 산화를 포함하는 지질분해의 저해에 의해 저장하는 동안에 저장-안정한 리포좀에서 유지된다. 이는 리포좀내에 포획된 수용액의 pH 가 이와 같은 분해저해에 공헌한다. 지질 가수분해는 양쪽성 지질 머리기 사이에 결합될때 일어나는데, 가령, 인지질 헤드기와 지방산 고리중 하나 사이의 에스테르 결합이 파괴되고 따라서 머리기와 두개가 아닌 하나의 사실사슬이 있는 지질인 리포리피드가 형성된다. 따라서, 리소리피드 형성은 인지질의 화학적 안정성의 척도이다. 산화는 열과 및과 같은 인자에 의해 개시되는 방응으로 자유라디칼 형성을 위해 산소분자를 이용한다. 지질산화는 불포화된 지방산에 이중결합을 파괴하고 따라서 지질이 분해된다. 지질산화는 본 기술에 숙지된 자에 의해 감지되고 실행될 수 있다. 지질가수분해와 산화는 리포좀의 지질성분의 초기 순도측정과 리포좀의 준비에 사용되는 지질에 상응하는 리소포스포리피드와 자유 지방산의 초기함량을 측정함으로써 검사할 수 있다. 지질순도와 리소포스포리피드와 자유 지방산 함량은 저장후에 측정될 수 있고 지방 산화를 측정하기 위해 초기값과 비교한다. 리포좀 제조물에 지질순도와 리소포스포리피드와 자유 지방산 함량을 결정하기 위한 방법은 본 기술분야에 잘 공지되어 있다.

<110> "초소지질 가수분해"와 "최소 지질산화"의 의미는 저장-안정한 리포좀의 형성을 위해 사용하는 모든 지질이 저장동안에 그대로 남아있음을 의미한다. 가수분해와 산화의 최소화의 의미는 지질의 순도가 저장동안에 감소하지 않고 리소포스포리피드와 자유 지방산 함량이 저장동안에 증가하지 않음을 의미한다. 일반적으로 저장-안정한 리포좀에 순수지질의 약 15% 미만이 가수분해되거나 산화되는데 바람직하게는 10% 이하, 더욱 바람직하게는 약 5% 가 가수분해되거나 또는 산화된다.

<111> 가령, EPC 와 pH 6.5 가 되는 수용액을 이용하여 다음의 과정에 따라 리포좀이 형성된다. 생성 리포좀에서 EPC 순도는 초기에는 일반적으로 96.5% (표 7-16)이고 리소포스파티딜콜린 함량은 약 0.4% 이다. EPC 순도는 6개월, 1년, 1년 6개월, 2년동안 저장후에도 동일하다. 리소포스포리피드 함량도 증가하지 않았다.

<112> 일반적으로 저장 안정한 리포좀중 적어도 75% 크기가 1.2-9.6 미크론, 적절하게는 약 95% 가 이 범위에 속한다. 9.6 미크론 이상을 가지는 리포좀 비는 10% 이하이고 적절하게는 5% 가장 바람직하게는 2% 이하가 된다. 1.2 미크론 이하의 크기를 가지는 리포좀 비율은 약 10% 미만, 바람직하게는 5% 이다. 이와 같은 크기분포는 최고 2년이상 리포좀 저장동안에 유지된다.

<113> 이와 같은 저장 안정한 리포좀은 일반적으로 비-안정한 강화 pH 에서 형성된 리포좀 보다 누출이 적고 결과적으로 리포좀내에 포획된 또는 열합된 고유 생활성제의 더많은 비율을 유지된다. 생활성제 누출은 지질 가수분해, 산화 그리고 다른 지질분해와 같은 최소분해를 통하여 이중층 통합유지에 의해 저장-안정한 리포좀에서 최소화된다. 가령, EPC, 젠타마이신, pH 6.5 를 이용한 전술한 과정에 따라 형성된 리포좀은 저장동안에 리포좀에 포획된 고유 젠타마이신 양의 15% 이하가 누수되고 그리고 젠타마이신 85% 이상이 저장동안에 유지된다.

<114> 일반적으로 pH 4.5 인 수용액에서 형성된 EPC 포함 리포좀은 초기 리포좀 제조에 유사한 EPC순돈(표17-20)를 가진다. 그러나, 유사한 시간동안 저장후에, 이와 같은 리포좀은 EPC 순도에서 감소하는 경향을 나타내고 리소포스포리피드 함량이 상당히 증가하게 된다. 또한, 1.2 미크론 이하크기를 가지는 리포좀 비가 이 pH 에서 형성된 리포좀 보다 더크고, 1.2 미크론 내지 9.6 미크론 범위의 크기를 가지는 리포좀은 6.5 pH 강화에서 형성된 리포좀 보다 적다. 이와 같은 리포좀은 일반적으로 안정성-강화 pH 에서 형성된 리포좀 보다는 더많은 비율의 생활성제의 누출을 나타내고 즉, 저장동안에 리포좀내에 남아있거나 포획된 고유 생활성제는 안정성 강화 pH 를 가지는 수용액에서 형성된 리포좀의 경우보다 훨씬 적다.

<115> 또한, 독립적인 모델 측정에 기초하여, 리포좀의 1/2을 하는데 요구하는 시간은 낮은 pH 에서 형성된 리포좀 보다는 상당히 긴것과 같은 저장-안정한 리포좀의 반감기를 감소하는 경향이 있다(가령, pH 4.5 에서 저장 안정한 리포좀의 집단은 더낮은 pH 의 경우에 4.10+/-1.15 시간에 반해 약 5.04+/-1.91 시간의 순환 반감기를 가진다. 또한 낮은 pH 리포좀과 저장 안정한 리포좀에서 각각 뇨에 배설된 투여한 젠타마이신의 % 은 81.58+/-10.96 와 76.16+/-11.81이다). 자유 혈장 젠타마이신 양은 저장-안정한 리포좀보다 더 낮은 pH 기에서 높게 나타난다(Cmax 와 AUC 최종치는 115.67+/-51.42mg/ml 와 90.842+/-51.4mg-hr/ml 와 57.31+/-29.00 와 44.39+/-6.778). 낮은 pH 기에서 젠타마이신 자유부분은 저장-안정한 리포좀보다 2배가 된다.

<116> 따라서, 저장-안정한 리포좀은 최소 리포좀 분해시간동안 저장될 수 있다. 따라서 제조물이 상당량으로 제조되기 때문에 이와 같은 제조물의 치료요법적 투여시에 생활성제를 포함하는 리포좀성 제형과 관계하여 유용하다. 제조물은 다량으로 제공될 수 있고 이는 상당시간동안 개체에 안전하게 사용할 수 있다.

<117> 일반적으로, 본 발명의 저장-안정한 리포좀에서 생활성물질에 대한 지질의 비율(w/w)은 1:20 은 생활성제비율(w/w)은 1:5 내지 1:15가 되고, 바람직하게 생활성제의 비율은 1:10 이 된다. 일반적으로 저장-안정한 리포좀에 수용액이 염용액이 되고 시트르산 완충액과 같은 수용성 완충액을 포함하는 리포좀 형성과 관계하여 적절히 이용할 수 있는 다른 용액이 될수도 있다.

<118> "안정화-강화 pH"는 지질 가수분해와 지질산화를 포함하는 지질분해가 저해되는 수용액의 pH 를 의미한다. 바람직하게는 저장-안정한 리포좀에 사용된 수용액의 안정-강화된 pH는 pH 5.5 내지 pH 7.5 이다. 좀더 바람직하게는 안정화 강화 pH 는 약 6.5 이다.

<119> 따라서, 본 발명의 적절한 구체예에서, 저장-안정한 리포좀은 아미노글리코시드 항생제, 실제 순수 에그 포스파티딜콜린과 pH 6.5 인 수용성 염용액으로 구성되고, 리포좀은 수용성 격실에 포획된 용질로 구성되고, 다층 라멜라 리포좀의 격실내에 용질농도는 실제 동일하고, 이때 순수한 에그 포스파티딜콜린은 적어도 85% 순도이고 실제 리소리피드가 없고 이때 젠타마이신에 대한 EPC 의 비율(w/w)은 1:15 내지 1:5 이다. 적절하게는 아미노글리코시드 항생제는 젠타마이신, 아마카신 또는 토브라마이신이고, 가장 적절하게는 아미노글리코시드 항생제는 젠타마이신이다.

<120> 다음의 실시예는 본 발명의 구체예를 설명한 것이고 이에 본 발명의 한정시키고자 함은 아니다.

<121> 실시예 1

<122> 시트레이트 완충용액(pH 4) m)은 축의 바닥에 부착된 3인치 Lightnin A-200 임펠라를 가지는 자석 결합된 혼합 어셈블리 Model 40310 이 장치된 3리터 유리 반응용기내에 넣고, 임펠라의 회전은 벤취-톱 모터 콘트롤러 1 510122R20 (Applikon Dependable Instruments, Inc., Foster City, California)에서 시판하는 것에 의해 조절할 수 있다. 반응기는 도면1에 나타낸 반응기에 상응하는 모양이다. 혼합어셈블리는 작동되고 축은 1000rpm 으로 회전하고, 이로써 등속도로 임펠라가 회전하게 된다.

<123> 68.6g EPC 와 27.6g 콜레스테롤이 비이커에 첨가된다. 191.8g 메틸렌 클로라이드를 첨가하고 용해될때까지 지질혼합물이 교반된다. 용매 대 수용상의 용적비는 0.18:1 이고 지질양은 117gm/ml 이다. 생성유기상은 반응기에 첨가한다.

<124> 질소기체가 도면1에 나타낸 살포 어셈블리 튜브를 통하여 0.04 1/min 에서 살포된다. 그다음 반응기의 온도는 재킷을 통하여 온수를 순환시킴으로써 점진적으로 30℃ 로 상승시킨다.

<125> 적어도 3시간후에, 실제 모든 염화메틸렌이 질소기체(0.1%미만이 남아있음, <0.2g)에 의해 제거되고, 리포좀 집단이 반응기내에 형성된다. 리포좀은 전술한 동일 시트레이트 완충액과 함께 1000ml 용적에 넣는다.

<126> 생성 리포좀의 입자크기는 통상의 방식으로 약 1200nm 이하의 입자크기를 가지는 리포좀에서는 NICOMP Model 270 Submicron Particle Sizer 를 이용하여 측정하고, 120nm 이상의 크기의 직경을 가지는 리포좀에서는 Malvern 3600 E Laser Diffraction Particle Sizer 를 이용한다.

<127> 실시예 2-8

<128> 실시예1에 나타낸 실험과정은 표2에서 나타낸 것과 같이 혼합속도, 비활성 기체유속과 반응온도

를 다양하게 함으로써 실시예2-8을 반복한다. 실시예1-8의 각 평균입자크기는 이미 설명한 것과 같은 방식으로 측정하고 그 결과는 표2에 나타낸다.

표 2

실시예	혼합 속도 (RPM)	비활성 유동기체 (L/min)	반응 온도 (Degrees C)	평균 입자 크기 nm*
1	1000	0.04	30	245
2	2000	0.04	30	218
3	1000	0.8	30	2800
4	2000	0.8	30	247
5	1000	0.04	50	202
6	2000	0.04	50	200
7	1000	0.8	50	2635
8	2000	0.8	50	226

* 각 리포좀의 직경 총합을 리포좀 총수로 나눈 것임.

<130> 표2에 데이타에서 본 바와 같이, 혼합속도, 비활성 기체유속(살포속도) 그리고/또는 반응속도는 리포좀의 평균 입자크기에 영향을 준다. 혼합속도는 증가시키면서 (1000 에서 2000rpm 으로) 살포속도와 반응온도는 일정하게 유지시켜서 실시한 실시예1과 2의 비교는 평균 입자크기가 감소되었다. 실시예1과 3의 비교에서 살포속도를 증가시키면서 (0.04 내지 0.8L/min) 혼합속도와 반응온도는 유지시키면 리포좀의 크기는 증가한다. 단지 반응속도만 증가시키는 경우(실시예 1 과 5의 비교). 리포좀의 크기는 일반적으로 감소한다.

<131> 본 발명 이전에 서요의 평균 입자크기의 리포좀 집단을 얻기 위해서는 상단한 비용과 시간이 소모되는 여과 과정이 요구된다. 이는 입자크기에 가장 영향을 끼치는 공정변수의 선택이 무작위로 되기 때문이다. 본 발명에 따르면, 입자크기에 가장 영향을 끼치는 주요변수는 확인되었고 주요변수의 값으로 진행된 공정은 일정한 방식으로 선택된다. 식(1)은 주요변수와 연관되고 상수Bo-B33 은 평균입자크기(Y)에 가장 영향을 끼치는 것이다.

<132> 상수 Bo-B33 을 결정하기 위한 데이타 분석은 Design-Expert 를 이용하여 실시된다(STAT-EASE, Inc). 식1에 제시한 모델에 양호하게 적합하기 위해 표2에 나타낸 실시예1-8에서 평균입자크기의 los 10 변환을 얻을 수 있다. 상수값은 표3에 나타내에 있다 .

표 3

상 수	값
B_0	2.413100
B_1	-0.286392
B_2	0.299464
B_3	-0.023978
B_{12}	-0.258263
B_{13}	0.004272
B_{23}	0.007034
B_{11}	0.185706
B_{22}	0.053462
B_{33}	-0.009501

<134> 표3에 나타낸 상수에서 몇가지 경향이 관찰된다. 음수상수는 인자(가령, 혼합속도)의 증가함에 따라 입자크기가 감소한다. 즉, 인자가 증가할때 리포좀의 평균크기는 일반적으로 감소된다. 양수상수인 경우 역이 성립한다. 두개 최대 음수상수는 혼합속도(B1)과 혼합속도와 비활성기체유속(B12) 사이의 상호작용과 연관된다. 최대 양수상수는 비활성유속(B2)와 연관된다. 또한 혼합속도(B11)의 2차형으로 상대적으로 큰양수상수와 연관된다. 이와 같은 양수 2차형의 의미는 혼합속도가 증가함에 따라 평균 입자크기가 음수 1차형(B1) 때문에 감소 되는 대신에 증가되기 시작하는 점이된다. 비활성 기체유속과 반응속도의 2차형은 표3에 나타내었다.

<135> 실시예 9-16

<136> 실시예 1-8에서 확이된 과정과 장치는 표4에서 나타낸 환합속도, 비활성 기체유속과 반응온도를 이용하여 반복한다. 데이타는 식(1)에 넣어 예정되는 평균 입자크기를 계산하다. 실제 입자크기는 실시예 1-8에서 상술된 것과 같은 동일한 방식으로 결정된다. 조건과 예상치 그리고 실제 평균입자크기는 표4에 나타내었다.

표 4

실시예	혼합속도 (RPM)*	비활성기체 유속 L/min	반응 온도 Degree C	예상된 평균 입자 크기 nm	실제 평균 입자 크기** nm
9	1000	0.04	30.0	243.76	251
10	2000	0.04	30.0	226.78	225
11	1000	0.80	30.0	2,884.07	2797
12	2000	0.80	30.0	248.66	266
13	1000	0.04	50.0	209.26	204
14	2000	0.04	50.0	203.86	208
15	1000	0.80	50.0	2,641.65	2635
16	2000	0.80	50.0	238.50	250

* 축의 회전속도에 의해 측정됨

** 각 리포좀 직경의 총합을 리포좀수로 나눈 것임.

<138> 표4에서 실시예 9-16이 각각에서 예측된 평균 입자크기는 실제 평균입자크기에 상당히 연관된다. 테스트 데이타는 본 발명이 미리 선택된 평균입자크기에 상응하는 리포좀 집단을 얻는 방법이다.

<139> 실시예 13,14,16에 따라 생산된 리포좀 집단의 크기분포는 실시예 1-8에서 언급한 입자 크기측정 기구를 사용하여 결정한다. 결과는 도면4-6에 나타낸다.

<140> 도면4-6은 각각 입자크기 범위내에서 모두 리포좀이 입자 크기를 가지는 단일-모델 집단을 가지는 리포좀을 나타낸다. 가령, 제4도는 대부분의 리포좀이 204nm 평균 입자크기와 동일한 또는 유사한 38.4 내지 786nm 범위내의 입자크기를 가지는 단일-모델 집단분포를 나타낸다.

<141> 도면5와 6은 도면4에 나타낸 결과와 일치한다. 도면5는 평균 입자크기가 208nm 인 53.9 내지 583nm 범위의 단일-모델 리포좀 입자분포를 나타낸다. 제6도는 평균 입자크기가 250nm 인 입자 크기분포가 25 내지 1553nm 인 단일 모델 리포좀을 나타낸다.

<142> 도면 4-6에서 나타낸 것과 같이, 실제 모든 리포좀은 소요의 평균 입자크기를 포함하는 단일-모델 집단분포내에 있다. 대부분 리포좀은 소요의 평균 입자크기와 동일하거나 유사하 크기를 가진다.

<143> 실시예 17

<144> EPC 14.0g 을 유기상에 만들기 위해 30ml 염화메틸렌에 용해한다. 용액은 도면1과 같은 형태의 반응용기에 넣고 200rpm 에서 혼합 어셈블리를 회전시킨다.

<145> 8.18g 황화 젠타마이신은 0.9% 염용액 150ml 에 용해시킨다. 생성용액은 200rpm 혼합속도하에 반응용기에 첨가한다. 반응혼합물에 지질양은 778mg/ml 이고 용매 대 수용성 용적비는 0.2:1 이다. 복합상의 pH 는 4.4. 이다.

<146> 온수는 가열된 재킷(44)에 의해 공급되어 반응기내에 온도를 35℃ 로 상승시킨다.

<147> 가열된 반응 혼합물은 1.0L/min 속도로 질소기체를 살포받는다. 2분이내에 형성된 점성겔이 나타나고 이는 제3도와 같은 모양이된다. 공정은 염화메틸렌 함량이 용적의 0.1% 이하로 감소될때까지 지속하고 리포좀이 형성된다.

<148> 생성 리포좀은 5℃ 에서 저장하는동안 수용성 격실내에서 누출되는 젠타마이신의 양을 측정함으로써 안정성에 대해 검사할수 있다. 그결과를 표5에 나타내었다. "%순도"는 주어된 시간동안에 리포좀내에 남아있는 젠타마이신의 평균을 나타낸다.

표 5

실시예	pH	용매:수용상 용적비	100일째 순도 %	200일째 순도 %
17	4.4	0.2:1	91%	91%
18	6.5	0.2:1	96%	96%

<150> 실시예 18

<151> 실시예17의 과정은 복합된 유기와 수용성상의 pH를 5ml 1N 수산화나트륨을 첨가하여 6.5 로 상승시키는 것을 제외하고 동일하게 반복한다. 생성 리포좀의 아정성은 실시예17와 동일한 방식으로 검사하고 그 결과는 표5에 나타내었다.

<152> 표5에서 볼수 있는 것과 같이, 더적은 양의 용매사용시에, 용매대 수용성상의 비율이 0.2:1 인 경우 우수한 안정성의 리포좀을 제공한다. 실시예17은 200일 후에 91% 순도를 나타낸다. pH 가 지질물질에 더 적응가능한 수준으로 상승되면 생성물은 더큰 안정성을 나타내고 200일 수에 96% 순도를 나타낸다.

<153> 실시예 19-25

<154> 실시예17의 과정은 표6에서 나타낸 용매 대 수용성비의 변화를 제외하고 반복실시한다. 리포좀에 젠타마이신양을 측정하고 표6에 그결과를 나타내었다.

표 6

실 시 예	용매 : 수용상 비율	생성물에 남아있는 젠타마이신 %
19	1.00:1	16.7
20	0.67:1	24.0
21	0.47:1	23.6
22	0.33:1	24.2
23	0.27:1	22.8
24	0.20:1	18.3
25	0.13:1	10.4

<156> 표6에서 볼수 있는 것과 같이 리포좀내에 남아있는 젠타마이신의 양은 통계적으로 유사하고 일반적인 생성물에 맞는 물질을 제공한다. 용매:수용성상의 비율이 0.13:1 인 경우 리포좀 생성물은 생성물내에 남아있는 젠타마이신의 양의 훨씬 더적은 것으로 형성된다.

<157> 실시예 26

<158> 와과적 상처 감염을 예방하기 위해 겔-연합된 조성물의 효과는 다음과 같이 하는데 이때 조성물은 정상 상처치료 과정에 효과가 있는지를 평가한다.

<159> 모든 과정은 외과적 기구와 드레이프 장갑을 이용하여 살균처리실에서 실행한다. 이용할 수 있는 동물모델은 기니아피그 또는 토끼로 등에 외과적으로 치명적인 박테리아 균주를 접종하였다. 또는 동물모델은 건강한 기니아피그 또는 토끼에서 연구된 결과에 따라 면역억제된 쥐를 이용할 수도 있다. 현재 테스트는 기니아피그를 이용하여 실행하였다.

<160> 테스트 샘플은 점성겔 형성시에 실시예17에 제시된 과정을 종료함으로써 얻어진 겔-연합된 준비물에서 만들어질 수 있다. 콘트롤로써, 적하안된 겔-연합된 준비물 또한 테스트하였다.

<161> 기니아피그는 등에 털을 깍아내고 짧은 털은 탈모제로 제거하여 준비하고 노출된 피부는 비누와 물로 세척한후에 Betadine® 용액으로 완전히 닦아내고 이소프로필알코올로 최종 닦아낸다. 동물은 Metofane® (메톡시퓨란)으로 마취한다.

<162> 각 2cm 길이의 2개 절개구분을 기니아피그의 등에 면도된 부위내 중앙선 각 양측에 만든다. 절개부는 근막까지 실시하나 근막을 통과하지는 않도록 하고 절개는 약 2x2cm 가 되도록 한다. 각 처리는 2번 반복실행하고, 포취는 동물양측에 있게된다.

<163> 동물은 보통의 외과상처에서 분리한 박테리아 현탁액을 접종시키는데 주요 박테리아 균주는 스타필로코커스 아우레우스가 되고 슈도모나스 에루기노사 또는 대장균이 포함될 수도 있다. 약물 샘플은 두개의 다른 과정에 의해 테스트될 수 있다. 한 과정에서 직접 접종후 약물시료를 즉시 도포한다. 접종후 상처는 봉한다.

<164> 동물과 상처는 매일 관찰한다. 동물이 심한 고통을 받는 것같으면 즉시 희생시킨다. 외과술후 7일에 동물은 CO2 실에서 죽인다. 각 상처는 상처감염의 신호가 있는지를 눈으로 확인하고 조직샘플은 양적인 박테리아 수로 헤아리기 위해 사용한다. 추가 조직샘플은 치료조직의 조직분속을 통해 사용한다. 이 경우에 처리된 상처는 처리안된 동물과 비교하고 즉, 젠타마이신을 포함하지 않는 점성겔로 처리한 것과 젠타마이신과 연합된 겔로 처리한것을 비교한다.

<165> 실시예 27

<166> 리포좀 조성물의 안정성 테스트는 다음과 같다. 젠타마이신을 포함하는 리포좀은 젠타마이신 농도가 4.5-6.75㎎/㎖ 총 인지질 농도가 40-60㎎/㎖ 전술한 것과 같이 준비한다. 리포좀 조성물의 총 성분은 현행 U.S.P. 요건을 충족한다. 조성물은 무균성, 피로겐 함량에 대해 테스트하고 현행 U.S.P 요건과 충족 하는지를 검사한다. 제조물에 잔류용매는 0.0078%(v/v)이다. 제조물은 준비후 또는 냉장고에서 5℃에 바로 저장한후 검사하고 준비후 다양한 시간간격에서 검사한다. 리포좀 조성물의 다음의 기준은 검사한다; 삼투농도(㎜ole/㎏); 제조물 pH(약 6.5); 외판(흰색에서 무색 불투명 분산); 과산화물 함량(㎖Eq/㎏); 입자크기(미크론); 자유(포획안된) 젠타마이신(이용가능한 젠타마이신 %); EPC 순도; 머리공간 산소함량(머리공간에서 % 산소); 지질통함(수화된 생성물 또는 EPC 지질과 같이 총 인지질%)등이다. 결과는 표 7,8,9,10,11,12,13,14,15 와 16에 나타낸다. 즉 각 데이타는 리포좀에서 얻을 수 있는데 즉 동일한 조건에서 리포좀이 준비되나 시간은 상이하다. 표17,18,19와 20은 동일조건하에서 준비된 리포좀의 좌표이다. pH 는 4.5 이다.

표 7, PART A

간격 (days)	제형 pH	입자 크기 (micron) 자유 젠타마이신 %			
		< 1.2	1.2 - 9.6	> 9.6	
0	6.4	0	98.1	1.9	12.7
189-245	6.6	1.5	98.0	0	8.1
397-413	6.6	3.3	97	0	13
554-565	6.5	0	100	0	10.1
743-783	6.5	1.0	99.0	0	8.2

표 7, PART B

간격 (days)	EPC 순도 (%)	헤드스페이스 O_2 (%)	지질 특합.			
			LysoPC	Sphingo	FFA	Un
0	96.5	0.5	0.4	2.9	ND	ND
189-245	98.0	<0.1	0.4	1.6	ND	ND
397-413	96	<0.1	0.9	2.7	<1.0	ND
554-565	97	0.2	<0.8	3.3	ND	ND
743-783	99.1	0.1	<0.8	2.9	ND	ND

Lyso PC : 리소포스파티딜콜린

sphimgo : 스핑고마이엘린

FFA : 자유 지방산

un : 불명확 ND : 결정되지 않음.

표 8, PART A

간격 (days)	제형 pH	입자크기 (microm) < 1.2	1.2 - 9.6	> 9.6	자유 젠타마이신 %
0	6.4	0	98.1	1.9	12.7
190-202	6.4	2	98.0	0	7.2
390-418	6.6	3.1	96.9	0	14
552-560	6.6	0.9	99.1	0	10.6
758-772	6.6	0.0	98.1	1.9	10.9

표 8, PART B

간격 (days)	EPC 순도 (%)	헤드스페이스 O_2 (%)	지질 결합 LysoPC	Sphingo	FFA	Un
0	96.5	0.5	0.4	2.9	ND	ND
190-202	93	2.9	2.8	2.4	1.7	ND
390-418	97	<0.1	0.3	2.3	0.2	ND
552-560	98	0.1	<0.8	1.6	ND	ND
758-772	97	0.1	<1.6	3.3	ND	ND

표 9, PART A

간격 (Days)	제형 pH	입자크기 (microns)			자유젠타마이신 %
		< 1.2	1.2 - 9.6	9.6	
0		0	98.1	1.9	12.7
189-245		2.3	98	0	8.4
406-427		—	97	0	11
554-565		0.1	99.9	0	9.4
743-783		0.2	99.8	0	7.7

표 9, PART B

간격 (days)	EPC 순도 (%)	헤드스페이스 O_2 (%)	지질 결합			
			LysoPC	Sphingo	FFA	Un
0	96.5	0.5	0.4	2.9	ND	ND
189-245	98	0.2	0.4	1.6	ND	—
406-427	96	0.17	0.9	2.7	<1.0	ND
554-565	98	<0.1	<0.8	2.4	ND	ND
743-783	97	<0.1	<0.8	2.8	ND	ND

표 10, PART A

간격 (days)	제형 pH	입자 크기 (microns) < 1.2	1.2 - 9.6	> 9.6	% 자유 젠타마이신
0	6.4	0	98.1	1.9	12.7
194-201	6.4	3	97	0	7.1
400-451	6.4	2.6	97.4	0	15
548-558	6.5	0.9	99.1	0	10.1
746-761	6.7	0.1	99.4	0.5	11.6

표 10, PART B

간격 (days)	EPC순도 (%)	헤드스페이스 O_2 (%)	지질 결합. LysoPC	Sphingo	FFA	Un
0	96.5	0.5	0.4	2.9	ND	ND
194-201	96	0.8	0.4	3.2	0.4	--
400-451	975	0.8	0.8	3.2	ND	ND
548-561	97	<0.1	<0.8	3.2	ND	ND
746-761	98	<0.1	<1.6	2.5	ND	ND

표 11, PART A

간격 (days)	제형 pH	입자 크기 (microns) < 1.2	1.2 - 9.6	> 9.6	% 지유 젤타피이닌
0	6.4	0	98.1	1.9	12.7
194-201	6.4	2	98	0	7
400-451	6.5	2.5	97.54	0	13.3
548-561	6.7	1.3	98.7	0	10.4
746-763	6.7	10.0	15.4	84.6	12.2

표 11, PART B

간격 (days)	탄소농도 (%)	헤드스페이스 O_2 (%)	지질 검정함 LysoPC	Sphingo	FFA	Un
0	96.5	0.5	0.4	2.9	ND	ND
194-201	96	0.8	0.4	3.2	0.4	ND
400-451	97	0.8	<0.8	2.4	ND	ND
548-561	97	<0.1	<0.8	3.1	ND	ND
746-763	98	<0.1	<1.6	2.5	ND	ND

표 12, PART A

간격 (days)	제형 pH	입자 크기 (microns) < 1.2	1.2 - 9.6	> 9.6	% 자유 겐타마이신
0	6.4	0	98.1	1.9	12.7
189-245	6.6	1.9	98.0	0	7.4
397-427	6.7	2.7	97.0	0	9.4
554-565	6.5	0.3	99.7	0	10.1
743-783	6.4	0.9	99.1	0.0	8.8

표 12, PART B

간격 (days)	EPC순도 (%)	헤드스페이스 O_2 (%)	지질 결합 LysoPC	Sphingo	FFA	Un
0	96.5	0.5	0.4	2.9	ND	ND
189-245	98	0.1	0.4	1.6	ND	--
397-427	97	0.1	0.9	2.7	ND	ND
554-565	99.7	<0.1	<0.8	2.4	ND	ND
743-783	99.1	<0.1	<0.8	2.9	ND	ND

표 13, PART A

간격 (days)	제형 pH	입자 크기 (microns) < 1.2	1.2 - 9.6	> 9.6	% 자유 젠타마이신
0	6.4	0	98.1	1.9	12.7
189-245	6.6	0.	99.8	0	6.4
397-427	6.7	2.5	91	6.2	9.6
554-568	6.5	0	99.9	0.1	9.2
743-783	6.3	1.0	99.0	0	8.8

표 13, PART B

간격 (days)	EPC 순도 (%)	헤드스페이스 O_2 (%)	LysoPC	Sphingo	FFA	지질 분획 Un
0	98.5	0.5	0.4	2.9	ND	ND
189-245	98	0.4	0.4	1.6	<0.9	–
397-427	96	0.2	0.9	2.7	<1.0	ND
554-565	97	0.1	<0.8	3.3	ND	ND
743-783	97.1	0.1	<0.8	2.9	ND	ND

표 14, PART A

간격 (days)	제형 pH	입자 크기 (microns) < 1.2	1.2 - 9.6	> 9.6	% 자유 젠타 마이신
0	6.4	0	98.1	1.9	12.7
190-202	6.4	2	98	0	7.4
390-451	6.6	2.4	97.6	0	9.4
552-564	6.6	0.7	99.3	0	10.1
758-773	6.6	0.1	99.0	0	8.8

표 14, PART B

간격 (days)	타이슨도 (%)	헤드스페이스 O_2 (%)	지질 분할 LysoPC	Sphingo	FFA	Un
0	96.5	0.5	0.4	2.9	ND	ND
190-202	93	4.4	2.8	2.4	1.7	ND
390-451	97	0.16	0.3	2.3	0.2	ND
552-564	98	0.2	<0.8	2.4	ND	ND
758-773	98	0.3	<1.6	2.5	ND	ND

표 15, PART A

간격 /days)	제형 pH	입자 크기(microns) < 1.2	1.2 - 9.6	> 9.6	자유 젠타마이신 %
0	6.4	0.0	98.1	1.9	12.7
189-245	6.6	1.5.	97	0	6.6
397-413	6.6	2.8	91	0	13
559-568	6.5	0.0	98.2	1.8	11.1
743-784	6.5	0.7	99.3	0	11.8

표 15, PART B

간격 (days)	EPC 순도 (%)	헤드스페이스 O_2 (%)	지질 결합 LysoPC	Sphingo	FFA	Un
0	96.5	0.5	0.4	2.9	ND	ND
189-245	98	0.4	0.4	1.6	ND	--
397-413	96	0.2	0.9	2.7	ND	ND
559-568	97	0.2	<0.8	3.3	ND	ND
743-784	98	0.3	<0.8	2.0	<0.8	ND

표 16, PART A

간격 (days)	제형 pH	입자 크기 (microns) < 1.2	1.2 - 9.6	> 9.6	자유젠타아이신 %
0	6.42	0	98.1	1.9	12.7
190-201	6.9	2	94	0	9.5
390-417	6.3	2	98	0.1	11
552-560	6.6	0.2	99.8	0.0	13.9
758-772	6.6	0.3	99.7	0.0	17.6

표 16 PART B

간격 (days)	EPC 순도 (%)	헤드스페이스 O_2 (%)	LysoPC	Sphingo	FFA	Un
0	96.5	0.5	0.4	2.9	ND	ND
190-201	93	3.6	2.8	2.4	1.7	ND
390-417	97	0.2	0.5	2.3	ND	ND
552-560	98	0.15	<0.8	2.4	ND	ND
758-772	98	0.1	<1.6	2.5	ND	ND

표 17, PART A

간격 (days)	제형 pH	입자 크기 (microns)			자유 젠타마이신 %
		< 1.2	1.2 - 9.6	> 9.6	
0	4.6	5.9	94.1	0	6.1
189-192	4.4	7.4	92.6	0	4.5
375-382	4.5	8.0	92.0	0.7	4.5
556-573	4.6	5.5	94.5	0	61
745-773	4.6	4.1	94.7	1.2	5.6

표 17, PART B

간격 (days)	EPC 순도 (%)	헤드스페이스 O_2 (%)	지질 결합			
			LysoPC	Sphingo	FFA	Un
0	95.9	1.7	0.5	3.1	0.5	--
189-245	93.0	--	1.7	2.7	2.7	ND
397-427	96.0	--	1.3	2.7	<0.4	ND
554-565	92	--	4.0	2.0	1.9	ND
743-783	88	<0.1	6.7	2.1	3.3	ND

표 18, PART A

간격 (days)	제형 pH	입자크기 (microns) < 1.2	1.2 - 9.6	> 9.6	자유 젠타마이신 %
0	4.6	5.9	94.1	1.9	6.1
374-383	4.5	9.0	91.0	0	4.1
551-579	4.6	4.7	95.1	0.2	5.9
752-787	4.7	2.8	97.2	0	5.6

표 18, PART B

간격 (days)	EPC 순도 (%)	헤드스페이스 O_2 (%)	지질 조합 LysoPC	Sphingo	FFA	Un
0	95.9	1.7	0.5	3.1	0.5	–
374-383	90.0	–	4.0	3.4	2.1	ND
551-579	85.0	–	9.1	3.3	2.5	ND
752-787	87.0	<0.1	6.7	2.8	4.0	ND

표 19, PART A

간격 (days)	제형 pH	입자크기 (microns) < 1.2	1.2 - 9.6	> 9.6	자유젠타마이신 %
0	4.4	7.9	91.7	0.4	10.7
114-151	4.5	7.5	91.9	0.6	10.8
224-234	4.4	7.5	91.5	1.0	10.6
558-560	4.5	7.9	92.0	0.6	8.7
780-815	4.5	6.4	92.1	1.5	11.1

표 19, PART B

간격 (days)	EPC순도 (%)	헤드-스페이스 O_2 (%)	지질 결합 LysoPC	Sphingo	FFA	Un
0	94.8	0.4	0.9	3.6	0.6	ND
114-151	90.8	–	2.3	3.6	2.4	–
224-234	90.9	0.28	2.0	4.4	2.1	ND
558-560	88	–	5.3	2.4	4.1	–
780-815	82.4	0.8	8.3	2.3	6.1	ND

표 20, PART A

간격 (days)	제형 pH	입자크기 (microns) < 1.2	1.2 - 9.	> 9.6	자유 젠타마이신 %
0	4.4	7.9	91.7	0.4	10.7
118-155	4.4	7.7	91.6	0.7	10.8
228-238	4.5	8.9	89.9	1.2	11.0
562-564	4.7	8.3	91.0	0.4	8.6
787-819	4.6	8.0	91.4	0.6	11.1

표 20, PART B

간격 (days)	EPC 순도 (%)	헤드스페이스 O_2 (%)	지질 결합 LysoPC	Sphingo	FFA	Un
0	94.8	0.4	0.9	3.6	0.6	ND
118-155	90.5	--	2.3	3.6	2.7	ND
228-238	90.3	0.31	2.0	4.4	2.5	ND
562-564	89	--	4.5	2.4	3.6	ND
787-819	83.7	0.2	9.0	3.1	3.8	ND

<181> 실시예 28

<182> 23마리 수컷 Sprague-Dawley 쥐(350-400g)을 두집단으로 무작위로 나누었다. 각 집단은 젠타마이신 양이 20mg/kg 으로 처리한다. 한집단은 pH 가 4.5 인 리포좀 젠타마이신(더낮은 pH; Lot # C0341, 4.8mg/ml 젠타마이신과 53.1mg/ml 총 인지질). 제2집단은 pH 가 6.5인 리포좀성 젠타마이신(더높은 pH Lot No. S0266, 6.0mg/ml 젠타마이신과 43.7mg/ml 총 인지질)을 수용한다.

<183> 사용된 장치와 시약 약물투여 시료수집, 젠타마이신 검사와 약리학적식은 다음과 같다:

<184> 2.4. 장치와 시약

<185> 2.4.1. TDx 분석기(Serial # 17734, Abbott Laboratories, Chicago IL)

<186> 2.4.2. TDx 젠타마이신 에세이 키트, 콘트롤, 계산기, Abbott Laboratories, Chicago, IL 에서 얻은 완충액

<187> 2.4.3. 펜토바르비탈 나트륨(Fort Dodge Laboratories, INC. Fort Dodge, Iowa)

<188> 2.4.4. AMICON Corporation Scientific System Division, Darivers, MA 에서 얻는 센트리콘-30-마이크로콘센터레이터(30,000Mw) 생성물 # 4209

<189> 2.5. 약물투여와 샘플수집

<190> 약물투여하기전에 기저혈장과 뇨샘플은 각쥐에서 수득한다. G-65 낮은 염화메틸렌 제형(Lot # C0341)의 20mg/kg 정맥내(꼬리정맥) 알약을 쥐의 한 집단(B group)에 투여하고 제2집단(B group)은 유사 약량의 G-65 pH 조성된 제형 (Lot # S0266)을 수용한다.

<191> 각 쥐에 약물 투여후에 혈액 100 내지 500ul 을 시트레이트플러쉬 1 cc 주사리를 사용하여 0.083, 0.25, 0.50, 1.00, 2.00, 4.00, 6.00, 10.00, 12.00, 16.00, 20.00, 24.00, 36.00 및 48.00 시간대에서 뽑아낸다. 수득된 혈액샘플은 2분간 마이크로 원심기에서 원심분리한다. 혈장은 수득하고, 2.6 에서 상술하는 총젠타마이신과 자유 젠타마이신을 결정하기 위해 진행된다.

<192> TDx 희석 완충액과 대사 케이지를 세척하후에 각 쥐에서 배설된 뇨는 4.00, 8.00, 12.00, 24.00, 36.00, 48.00, 60.00, 72.00, 96.00 및 120시간대에서 취하다. 뇨샘플은 입자 찌거기를 제거하기 위해 5분간 원심분리한다. 뇨시료는 2.6 에서 설명한 젠타마이신 농도를 결정하기 위해 검사한다.

<193> 샘플 수집을 위해, 동물은 C02(드라이 아이스)로 마취시킨다.

<194> 2.6. 젠타마이신 검사

<195> 혈장과 뇨시료에 젠타마이신 농도는 Biological Sciences Report G65-009 에서 상술하는 것과 같이 TDx 시스템(Abbott Dignostic Lab)에서 형광 플로로화 면역검사기술을 이용하여 결정된다.

<196> 2.7. 약리학적 운동성 측정:

<197> 젠타마이신의 약리학적 운동성은 모델-독립적 방법을 이용하여 실시한다. 변수는 혈장농도-시간 곡선(AUC)와 트라페조이달 방법에의해 측정된 제1모멘트(AUMC)하에 결정한다. 제거반감기(t½β), 평균 잔류시간(MRT)와 총몸체 깨끗한 시간(Clt)와 정체상태에서의 분포용적은 다음과 같은 관계식이 성립한다:

$$t_{1/2\beta} = 0.693/\beta \qquad MRT = AUMC/AUC$$

$$Cl_t = Dose/AUC \qquad Vss = Dose(AUMC)/(AUC)^2$$

<199> 누적된 젠타마이신 뇨배출과 수득시간에 중간지점에서 배출속도는 뇨데이타에서 젠타마이신 침착을 측정할 수 있다. 신장세척(Clr)와 제거반감기(t½β)는 다음에서 계산할 수 있다:

$$Clr = XU^{\infty} / AUC \qquad t_{1/2\beta} = 0.693/\beta$$

XU∞는 $XU^{\infty} = XU^{120} + \frac{dxu/dt}{\beta}$ 에서 배설된 뇨의 양이고,

<201>

<202> XU120은 5일간 최종 누적배출된 뇨이다.

<203> General Linear Model(SAS Institute Inc., NC0는 두개 처리집단 사이에 젠테마이신 약리학적 변수에 차이를 결정하는데 사용된다.

<204> 약물투여후 일련의 혈액(기준 .083, .25.50, 1,2,4,6,8,10,12,16,20,24,30,36과 48시간)과 뇨(기준 4,8,12,24,36,48,60,72,96 과 120시간)을 형광 편광 면역검사(TDx Abbor Labs)를 이용하여 결정한다. 결과는 표21,22,23와 24 도면 7-13에 나타낸다.

<205> 혈장농도는 총 젠타마이신과 자유 제타마이신의 평균 제약웅동학적 변수를 측정하는데 사용된다. 더 낮은 pH 제형에서 AUC, Clt 와 Vss 는 795.34+/-278.78 ug-hr/ml, 27.80+/-8.65 ml/hr/kg 와 0.110+/-0.035 1/kg 로써 더 높은 pH 제형에서 809.02+/-377.25 ug/hr/ml, 29.39+-12.15 ml/hr/kg 와 0.132+/-0.029 1/kg 와 비교한다. 더 높은 pH기에 총 젠타마이신의 MRT 와 1/2 은 더낮은 pH 의 것보다 더길다(P<0.05)(4.97+/-1.39 hr 와 5.04+/-1.91h, 대 3.72+/-0.79 hr 와 4.10+/-1.15 hr, 각각). 자유 젠타마이신 부분은 더높은 pH기에서 57.31 와 29.00ug/ml 와 44.39+/-6.778 uh-hr/ml 와 비교할때 각 Cmax 와 AUClast 값이 115.67+/-51.42 ug/ml 와 90.842+/-51.42 ug-hr/ml 으로 더 크다. 뇨에서 방출된 투여 젠타마이신의 %는 더낮은 pH 와 더높은 pH 에서 각각 81.58+/-10.96 와 96.16+/-11.81 이다. 최종 배출속도(β)는 더높은 pH 처리기에 상당히 낮다(더 높은 pH 와 더 낮은 pH 제형에서 각각 0.017+/-0.004/hr, 대 0.021+/-0.005/hr), 또한 이에 상응하는 반감기가 더 길다(더 높은 pH 와 더 낮은 pH 제형에서 각각 43.31+/-13.26hr, 대 35.11+/-9.96 hr).

표 21.

쥐에서 pH 조정된 그리고 낮은 MeCl G-65 제형의 총 겐타마이신의 혈장 약리학적 운동성

변수	G-65 H 제형 (Lot # SO266) (N=11)	G-65 F 제형 (Lot # CO341) (N=12)
T½α (hr)	0.46(0.29)	0.81(0.31)
T½β (hr)	3.00(0.81)	3.32(0.42)
Vc (l/kg)	0.042(0.01)	0.042(0.01)
Vp (l/kg)	0.077(0.03)	0.041(0.01)
Vss (l/kg)	0.092(0.01)	0.092(.010)
Clc (ml/hr/kg)	0.139(0.047)	.068(0.025)
Clt (ml/hr/kg)	0.033(0.004)	0.029(0.003)

평균으로 나타낸 값 (SEM)

Formulae:
$T_{½\alpha} = 0.693/\alpha$ $T_{½\beta} = 0.693/\beta$ $Vc = Dose/(A+B)$ $Vp = Vc(K12/K21)$ $Vss = Vc + Vp$
$Clc = VcK12$ $Clt = Vc\beta$

표 22

쥐에서 pH 조정된 그리고 낮은 HCl

G-65 제형의 총 젠타마이신의 혈장 약리학적 운동성

변수	G-65 H- 제형 (Lot # SO266) (N=11)	G-65 F- 제형 (Lot # CO341) (N=12)
AUC (Ug-hr/Ml)	809.02(99.31)	795.34(95.08)
T½ (hr)	4.79(.34)	3.72(.32)*
MRT (hr)	5.04(.47)	4.10(.45)
Clt (ml/hr/kg)	29.39(3.15)	27.80(3.02)
Vss (l/kg)	.132(.010)	.110(.010)

↕ 평균으로 표현된 값 (SEM)

* pH 조정된 G-65 제형에서 차이 (P<.05)

Formulas:

T½ = 0.693/β MRT = AUMC/AUC Clt = Dose/AUC Vss = Dose(AUMC)/(AUC*AUC)

표 23.

pH 조정된 낮은 HeCl G-65 제형의
자유 젠타마이신의 혈장 약리학적 유동성

변수	G-65 H- 제형 (Lot # SO266) (N=9)	G-65 F- 제형 (Lot # CO341) (N=11)
AUC (Ug-hr/Ml)	56.78(29.44)	101.80(34.80)*
Cmax (ug/ml)	57.33(28.97)	115.67(57.09)*
T½ (hr)	2.22(2.07)	1.64(0.99)
MRT (hr)	2.66(2.49)	2.13(1.35)

평균값 표시된 값 (SD)
* pH 조정된 G-65 제형에서의 차이 (P<.05)

Formulae:
T½ = 0.693/β MRT = AUMC/AUC Cmax = concentration at 0.083 hr

표 24.

쥐에서 pH 조정된 그리고 낮은 HeCl

G-65 제제의 젠타마이신의 뉴 약리학적 운동성

변수	G-65 H. 제형 (Lot # SO266) (N=11)	G-65 F. 제형 (Lot # CO341) (N=12)
Dose Excreted (%)	76.16(3.56)	81.58(3.16)
Clt (ml/hr/kg)	33.36(4.32)	29.08(3.40)
Clr (ml/hr/kg)	25.16(2.84)	24.26(2.68)
T½ (hr)	35.11(3.00)	44.49(4.09)

평균치 표시됨. (SD)

Formulae:
$T_{1/2} = 0.693/\beta$ Clt = Dose/AUC Clr = X_{urine}/AUC

(57) 청구의 범위

청구항 1

사전결정되고 선택된 평균입자크기를 보유한 다층라멜라리표좀을 생산하는 공정에 있어서,

(a) 지질과 물-혼합불가능 유기용매로 구성된 유기상 및 수용상을 유기상 대 수용상의 용적비가 3:1이하가 되도록 복합시키고;

(b) 복합된 상은 하기 식(1)에 따라 결정된 속도, 온도, 비활성 기체유속에서 혼합하여 사전결정된 평균입자 크기를 보유한 다층라멜라 리포좀을 생산하고,

여기서 , 식 (1)은

$$y=B_0+B_1X_1+B_2X_2+B_{12}X_1X_2+B_{13}X_1X_3+B_{23}X_2X_3+B_{11}X^2_1+B_{22}X^2_2+B_{33}X^2_3$$ 이고,

y=소요 평균 입자크기;

X_1 = 혼합 속도;

X_2 = 비활성 기체 유속;

X_3 = 반응온도;

B_0상수;

B_1 = 반응 혼합속도의 주요효과에 대한 회귀상수;

B_2 = 비활성 기체유속의 주요효과에 대한 회귀상수;

B_3 = 반응온도의 주요효과에 대한 회귀상수;

B_{12} =혼합속도와 비활성 기체유속의 상호작용에 대한 회귀상수;

B_{13} = 혼합속도와 반응온도의 상호작용에 대한 회귀상수;

B_{23} = 비활성 기체유속과 반응온도의 상호작용에 대한 회귀상수;

B_{11} =혼합속도의 2차효과에 대한 회귀상수;

B_{22} = 비활성 기체유속의 2차효과에 대한 회귀상수;

B_{33} = 반응온도의 2차효과에 대한 회귀상수;

상기 비활성 기체유속의 범위는 0.4 내지 1.2ℓ /min이고;

상기 반응온도의 범위는 20 내지 80℃이고;

상기 혼합속도의 범위는 최고 2,000rpm이고;

추가로, 상기 다층라멜라 리포좀에 생활성제를 결합시키는 것을 특징으로 하는 공정.

청구항 2

제 1항에 있어서, 유기상 대 수용상의 용적비는 0.2:1 내지 1.0:1인 것을 특징으로 하는 공정.

청구항 3

제 1항에 있어서, 지질의 분해를 저해하는 수준으로 복합상의 pH를 조절하는 것으로 구성된 것을 특징으로 하는 공정.

청구항 4

제 3항에 있어서, 복합상의 pH는 5.5 내지 7.5인 것을 특징으로 하는 공정.

청구항 5

제 4항에 있어서, 복합상의 pH는 6.5인 것을 특징으로 하는 공정.

청구항 6

제 1항에 있어서, 다층라멜라 리포좀은 수용성 격실내에 포획된 용질로 구성되고, 이때 다층라멜라 리포좀의 수용성 격실에 각 포획된 용질농도는 동일한 것을 특징으로 하는 공정.

청구항 7

제 1항에 있어서, 생활성제는 아미노글리코시드 항생제인 것을 특징으로 하는 공정.

청구항 8

제 7항에 있어서, 아미노글리코시드 항생제는 젠타마이신, 스트렙토마이신, 디하이드로스트렙토마아신, 토브라마이신, 네오마이신, 파로마이신, 리보스타마이신, 리비도마이신, 카나마이신, 비오마이신, 시소미신, 네틸미신과 아미카신에서 선택되는 것을 특징으로 하는 공정.

청구항 9

제 8항에 있어서, 아미노글리코시드 항생제는 젠타마이신인 것을 특징으로 하는 공정.

청구항 10

제 1항에 있어서, 식(1)에 따른 조건중 적어도 하나를 변화시키고 다른 나머지 조건은 일정하게 유지시킴으로써 사전결정된 평균입자크기를 변화시키는 것으로 구성된 것을 특징으로 하는 공정.

청구항 11

제 10항에 있어서, 비활성 기체유속은 변화시키면서 혼합속도와 반응온도는 일정하게 유지시키는 것으로 구성된 것을 특징으로 하는 공정.

청구항 12

제 11항에 있어서, 비활성 기체유속과 혼합속도를 다양하게 하고 반응온도는 일정하게 유지시키는 것으로 구성된 것을 특징으로 하는 공정.

청구항 13

제 1항에 있어서, 지질양은 복합상에서 적어도 10mg/ml인 것을 특징으로 하는 공정.

요약

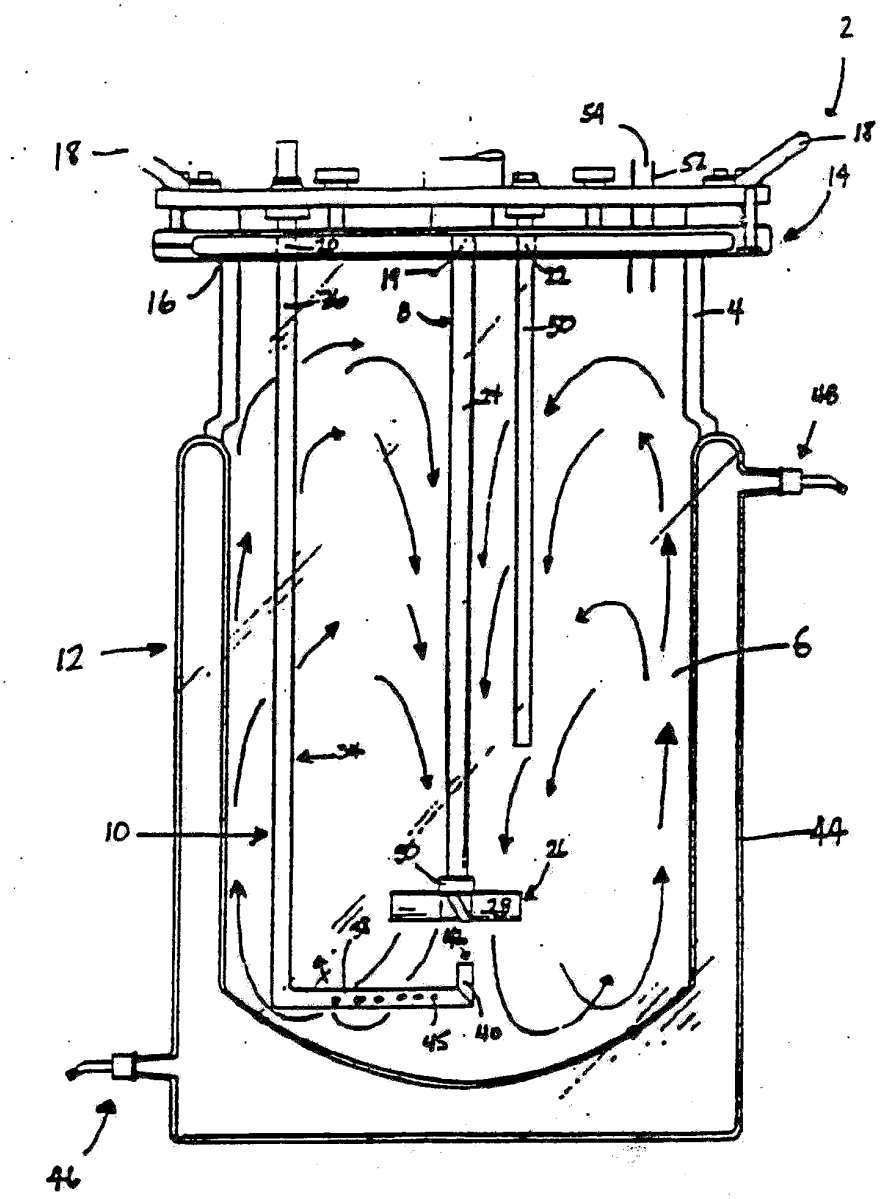
본 발명는 유기상 대 수용성상의 용적비가 3:1 이하로 복합하여 리포좀 생산에 관계하는데 이 공정은 미리 선택된 평균 입자크기를 포함하는 리포좀의 단일-모델집단 분포를 얻을 수 있는 조건하에 실행된다. 이 공정동안에 새로운 중간 생성물이 얻어지고 이 자체도 생활성제의 국소수송에 사용될 수 있다.

대표도

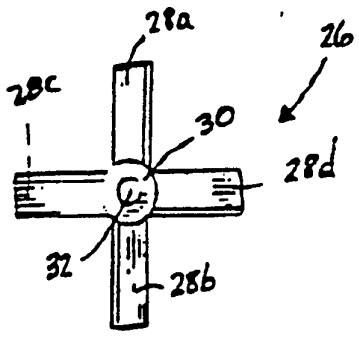
도1

도면

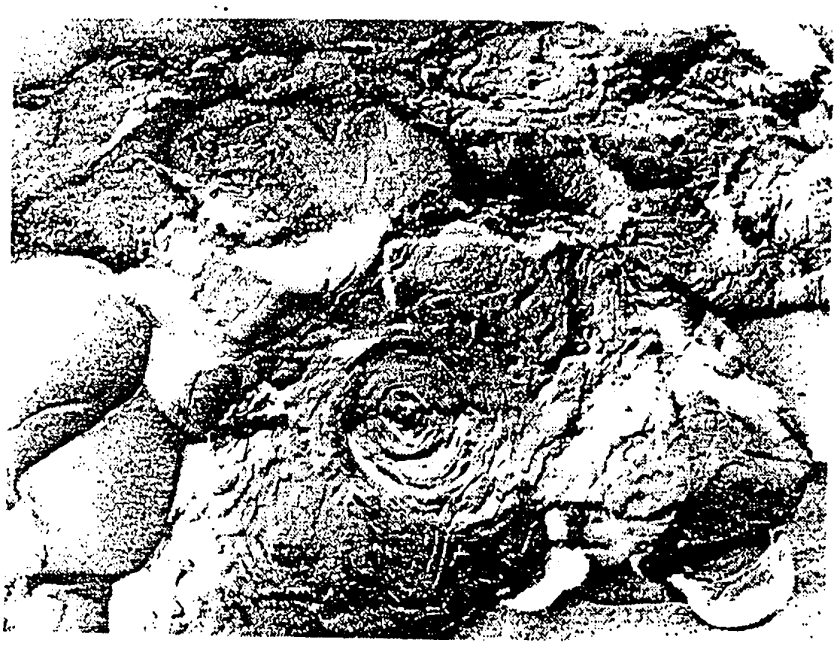
도면1



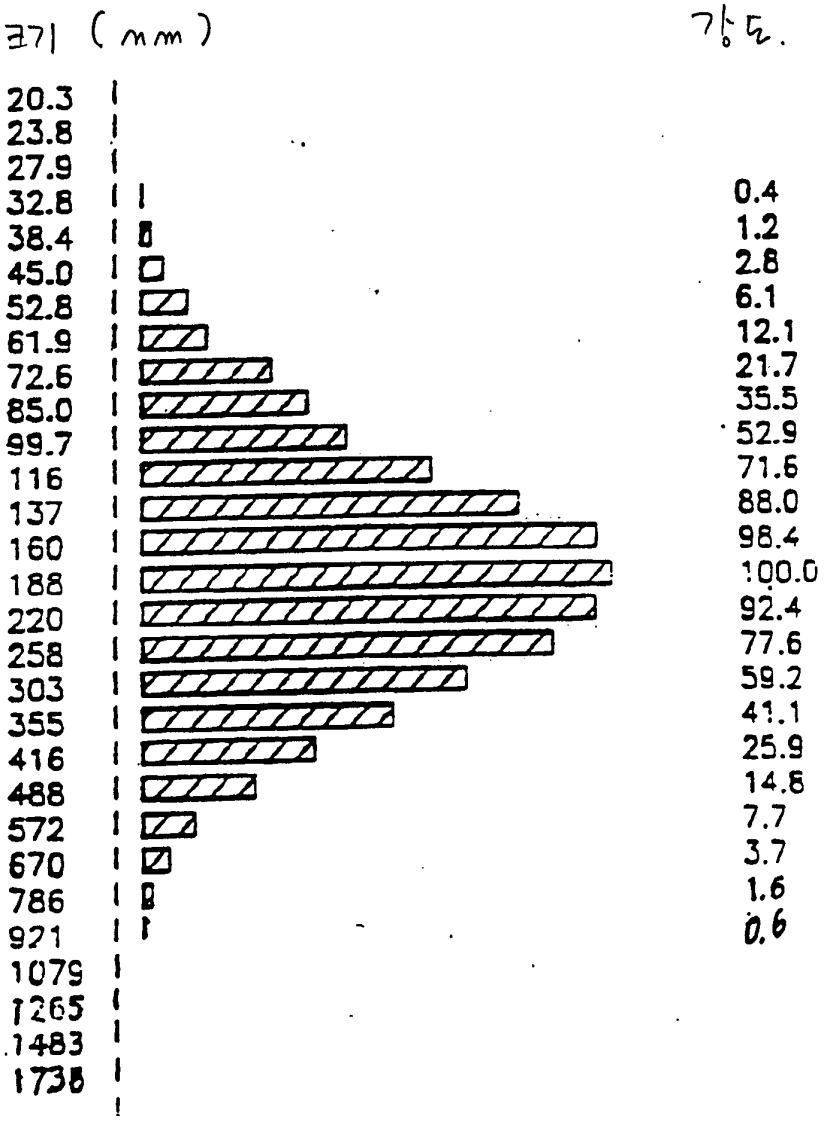
도면2



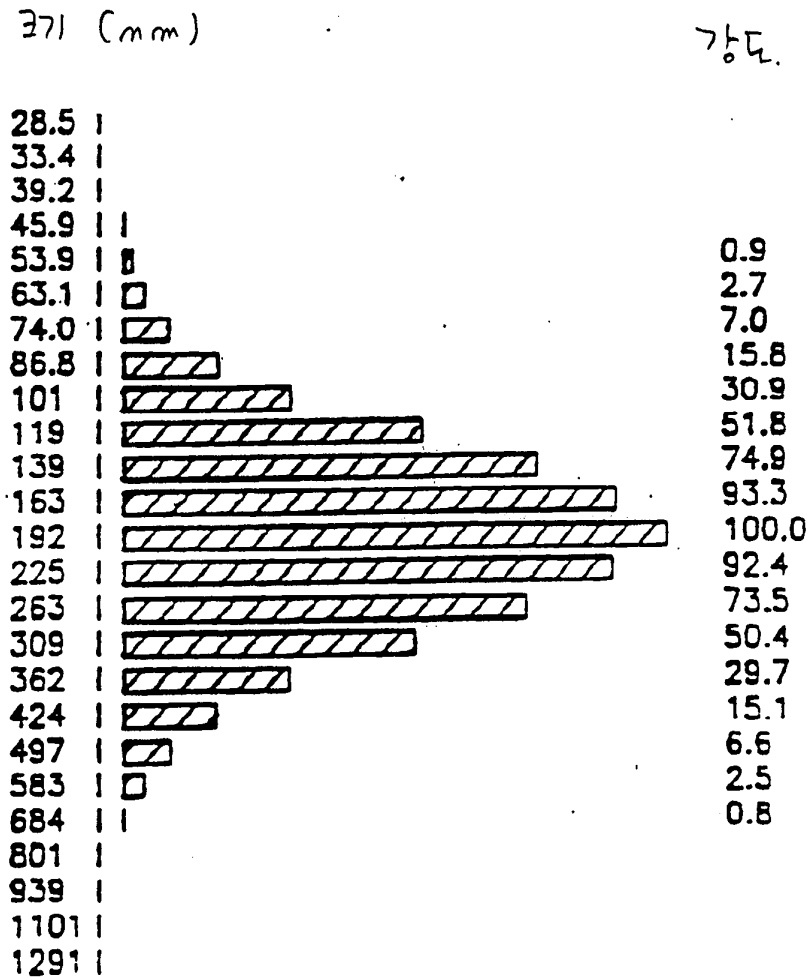
도면3



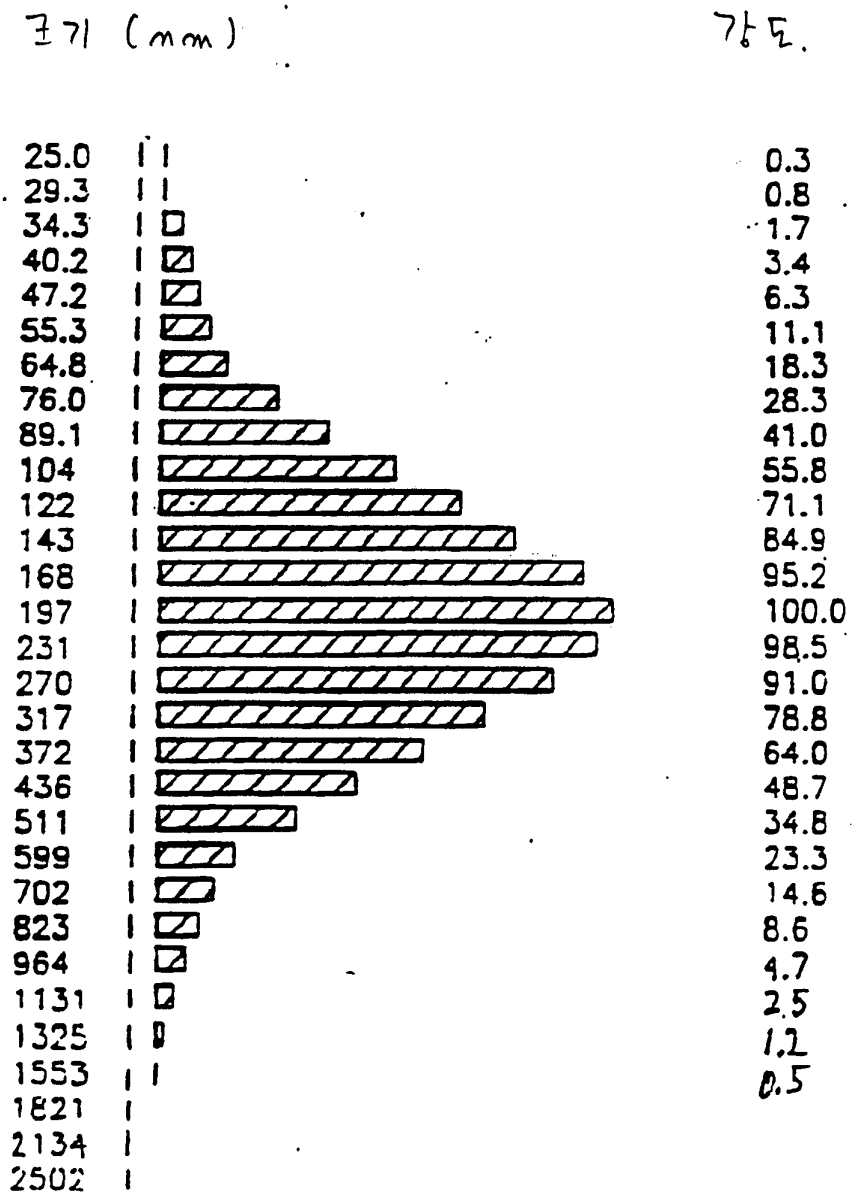
도면4


크기 (mm)
가도.
20.3
23.8
27.9
32.8
38.4
45.0
52.8
61.9
72.6
85.0
99.7
116
137
160
188
220
258
303
355
416
488
572
670
786
921
1079
1265
1483
1738
0.4
1.2
2.8
6.1
12.1
21.7
35.5
52.9
71.6
88.0
98.4
100.0
92.4
77.6
59.2
41.1
25.9
14.8
7.7
3.7
1.6
0.6

도면5

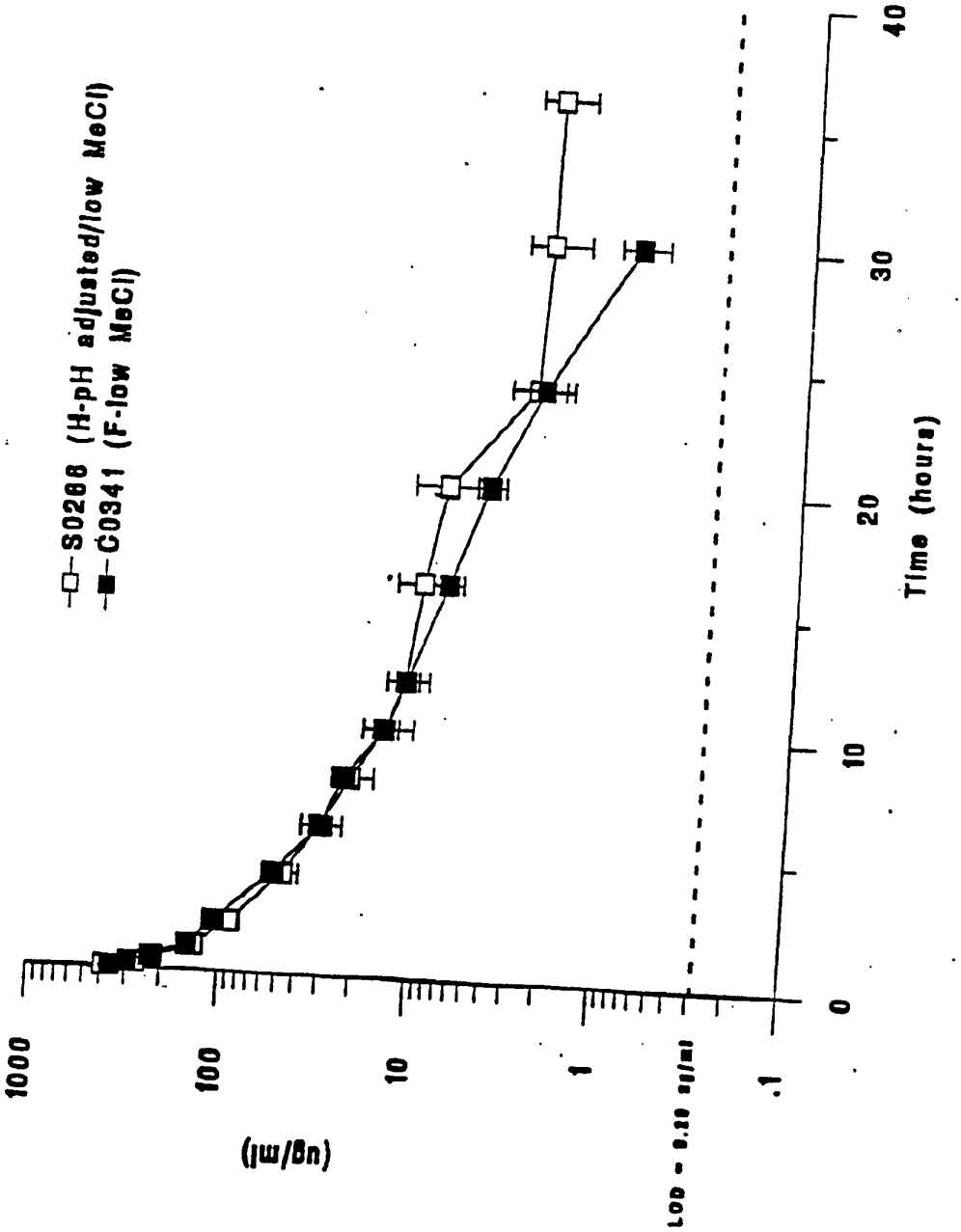

크기 (mm)
강도
28.5
33.4
39.2
45.9
53.9
63.1
74.0
86.8
101
119
139
163
192
225
263
309
362
424
497
583
684
801
939
1101
1291
0.9
2.7
7.0
15.8
30.9
51.8
74.8
93.3
100.0
92.4
73.5
50.4
29.7
15.1
6.6
2.5
0.8

도면6


크기 (mm)
강도.
25.0
29.3
34.3
40.2
47.2
55.3
64.8
76.0
89.1
104
122
143
168
197
231
270
317
372
436
511
599
702
823
964
1131
1325
1553
1821
2134
2502
0.3
0.8
1.7
3.4
6.3
11.1
18.3
28.3
41.0
55.8
71.1
84.9
95.2
100.0
98.5
91.0
78.8
64.0
48.7
34.8
23.3
14.6
8.6
4.7
2.5
1.2
0.5

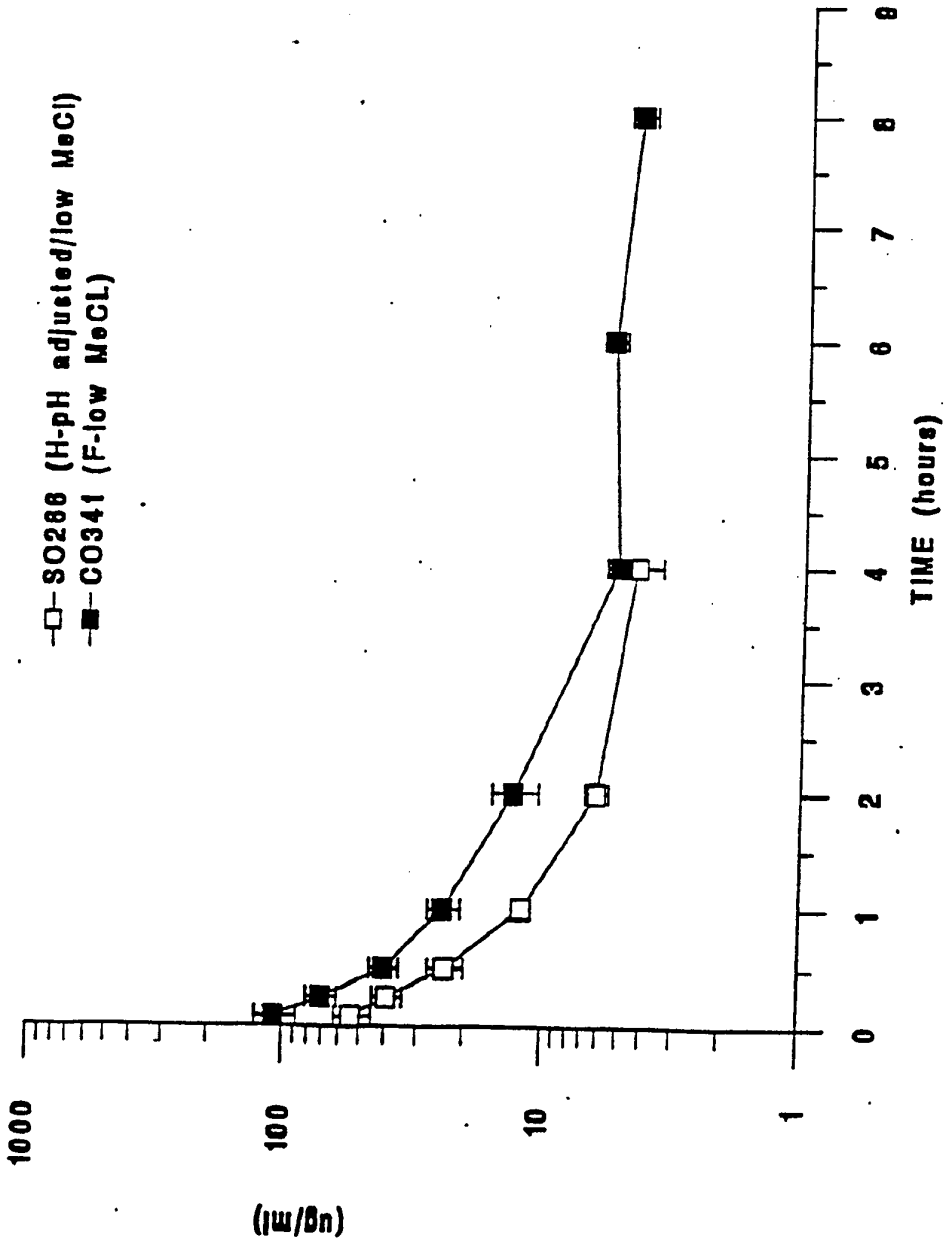
도면7

G-65 제86에서 총 젠타마이신 혈장농도.



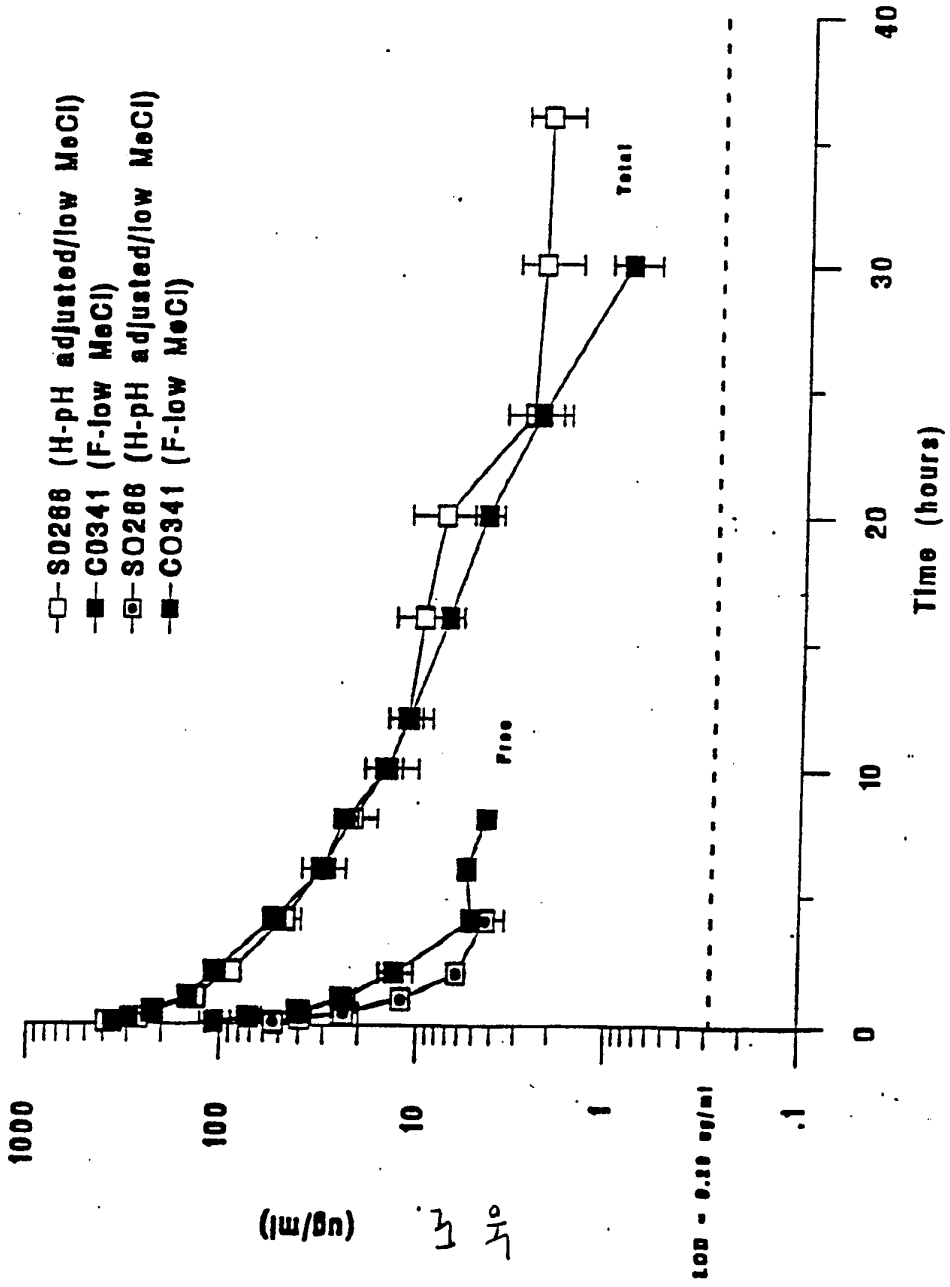
도면8

G-65 제제의 자유 젠타마이신 혈장 농도.

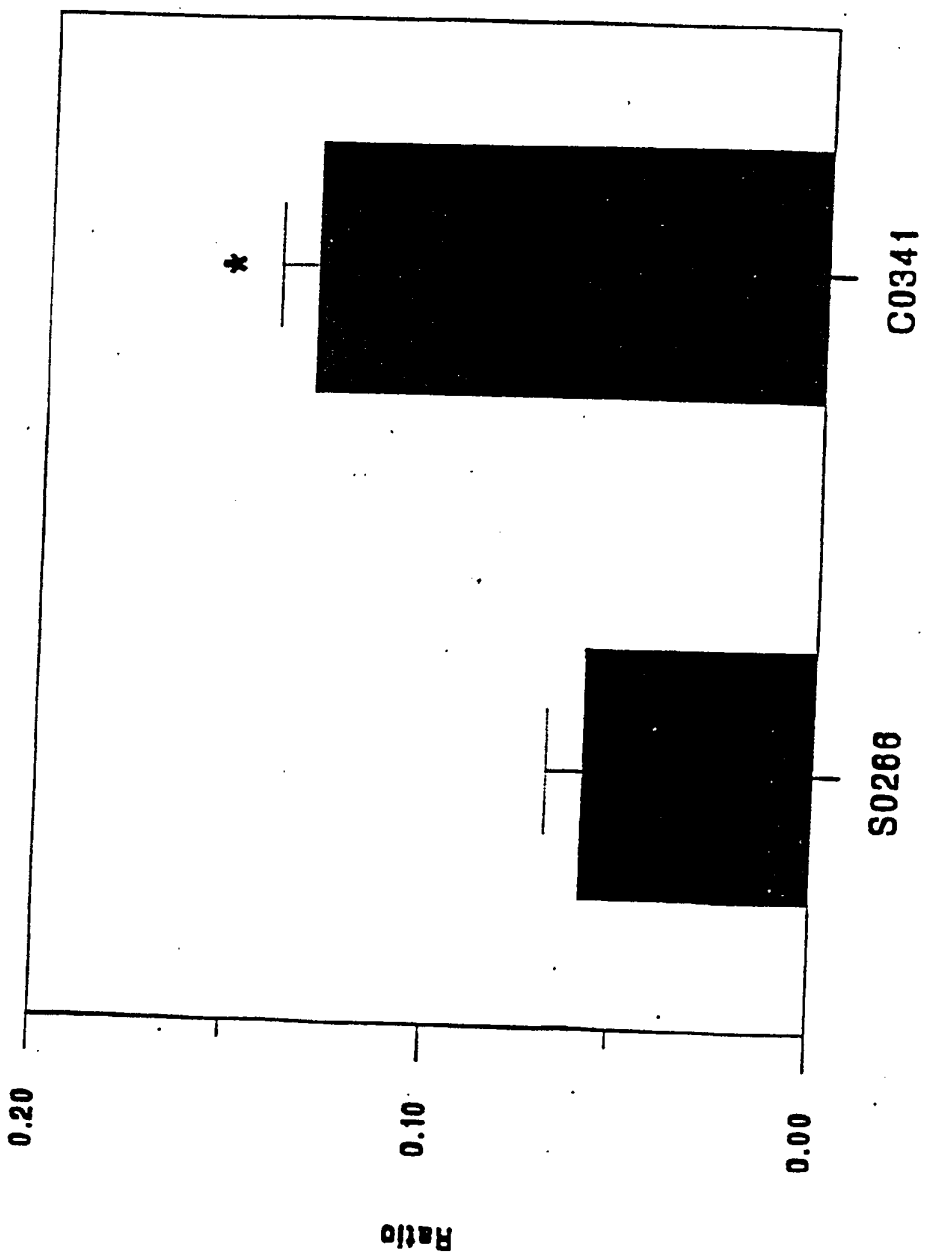


도면9

G-6h 제형의 전체와 자유 겐타마이신 혈장 농도.



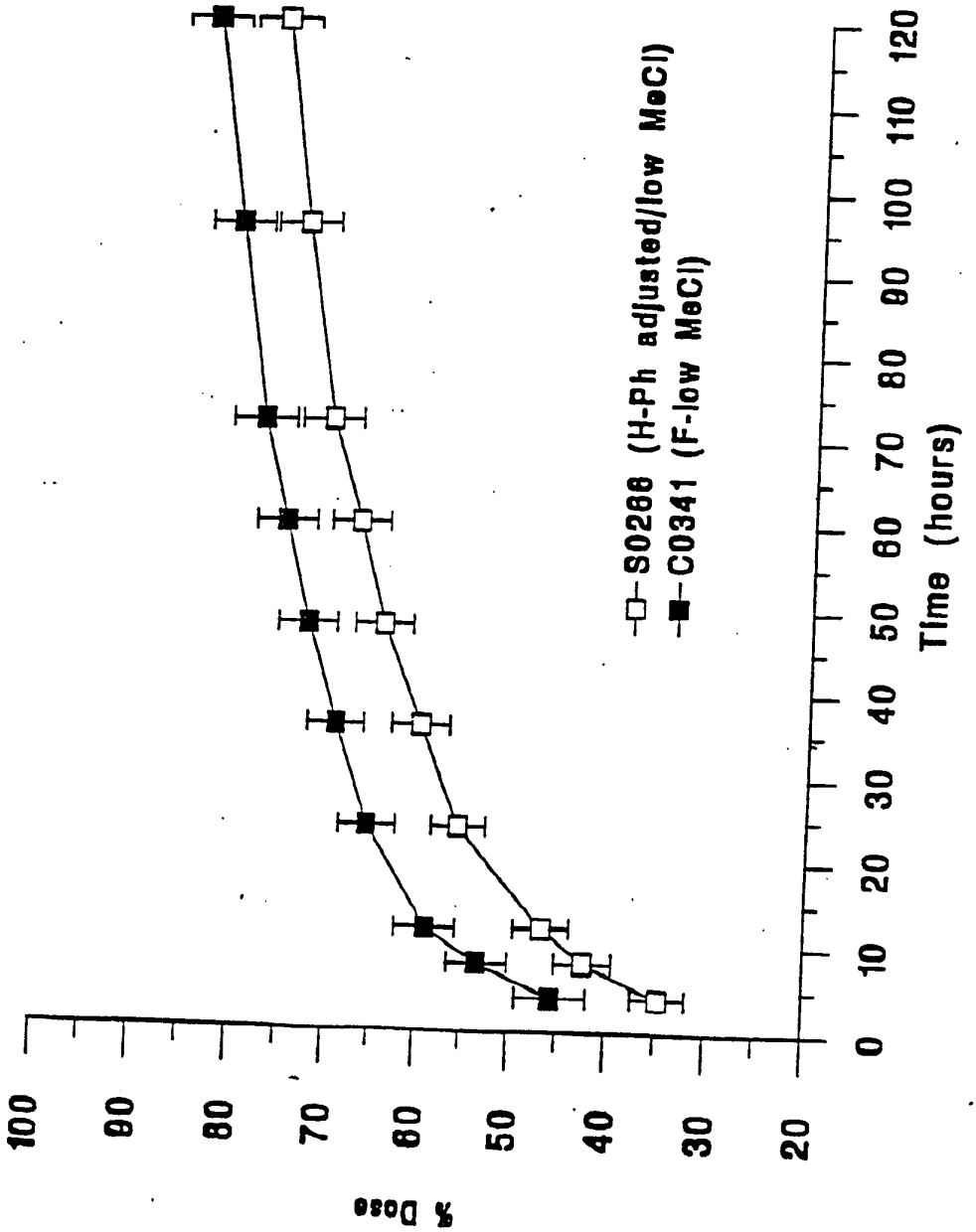
도면10



pH 조정된 낮은 MeCl 대 낮은 MeCl 수-하
의 DUC 비 (자유/정치)

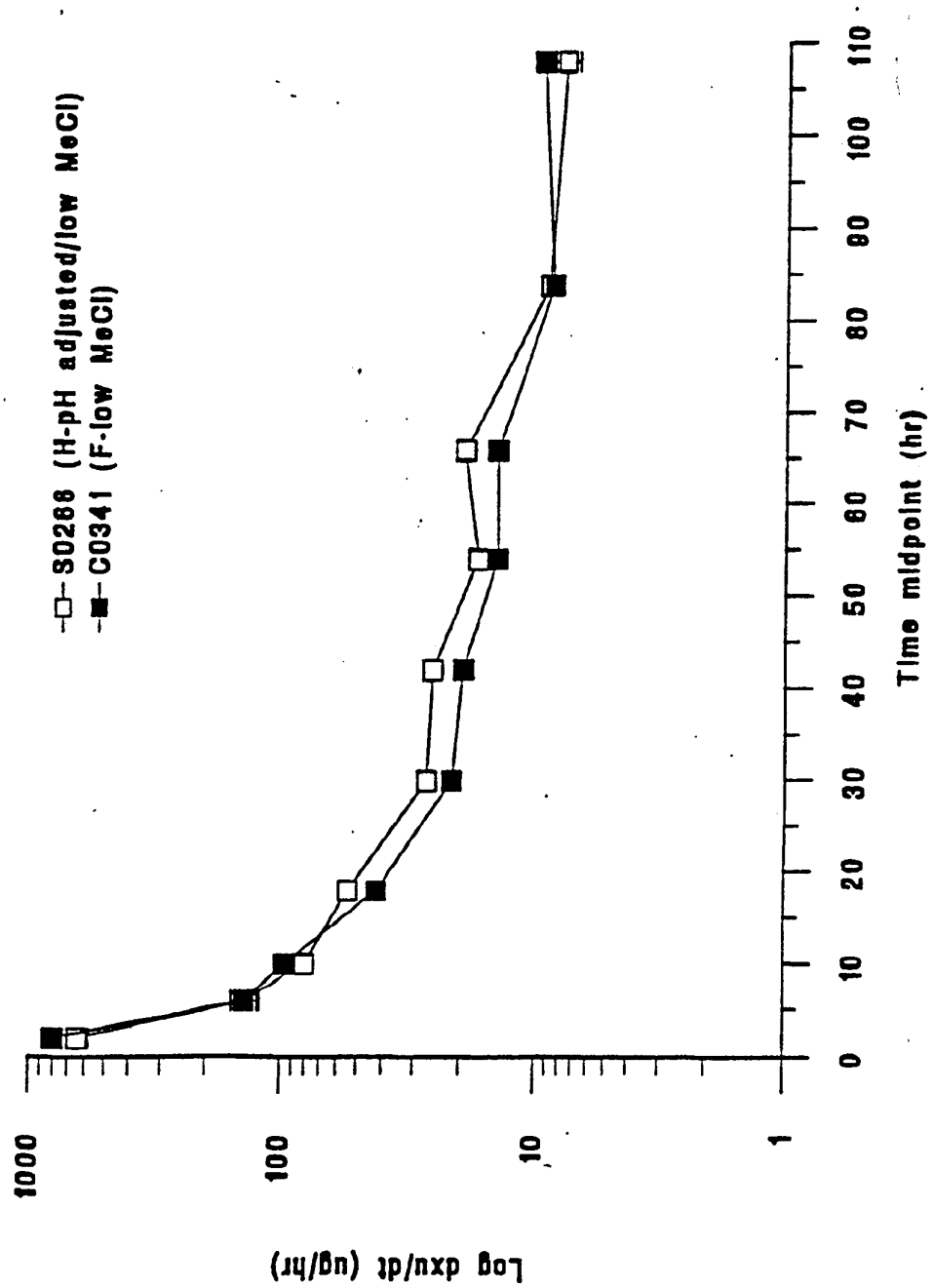
도면11

겐타마이신의 누적된 뇨 배출.



도면12

중앙지점에서 젠타마이신 뇨배출 속도 대 시간



도면13

